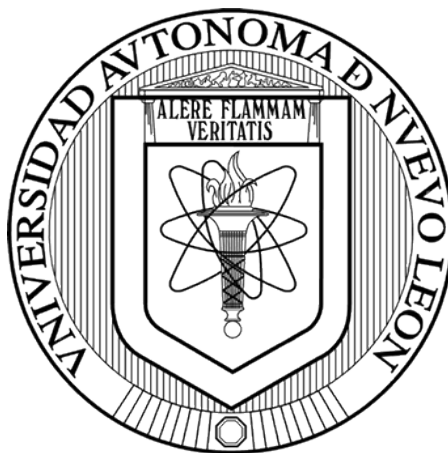


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EVALUACIÓN *IN VITRO*, *EX – VIVO* E *IN SILICO* DE
NUEVOS DERIVADOS DE 1,4-NAFTOQUINONAS SOBRE
EPIMASTIGOTE Y TRIPOMASTIGOTE DE *Trypanosoma cruzi*

POR

NOHEMI ALEJANDRA BECERRA RAMOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

OCTUBRE, 2018

**EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN SILICO* DE NUEVOS DERIVADOS DE
1,4-NAFTOQUINONAS SOBRE EPIMASTIGOTE Y TRIPOMASTIGOTE DE
Trypanosoma cruzi.**

**Este trabajo fue realizado en la Universidad Autónoma de
Nuevo León**

Cuerpo Académico de Epidemiología Veterinaria

Dirección: Dra. Karina Wendoline Vázquez Cisneros

Laboratorio de Virología

Dirección: Dr. Ramiro Ávalos Ramírez

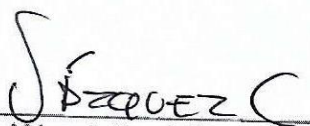
EVALUACIÓN *IN VITRO*, *EX-VIVO* E *IN SILICO* DE NUEVOS
DERIVADOS DE 1,4-NAFTOQUINONAS SOBRE EPIMASTIGOTE
Y TRIPOMASTIGOTE DE *Trypanosoma cruzi*


POR

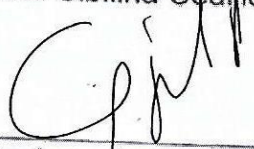
NOHEMI ALEJANDRA BECERRA RAMOS

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA EN
CIENCIA ANIMAL

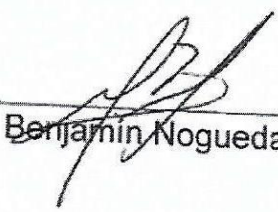
Aprobación de tesis:


Dra. Karina Wendoline Vázquez Cisneros


Dra. Sibilina Cedillo Rosales


Dr. Juan José Zarate Ramos


Dr. Cristian Salas Sánchez


Dr. Benjamín Nogueta Torres

AGRADECIMIENTOS

Se termina una etapa más en el área profesional, estoy eternamente agradecida porque a pesar de todas las emociones, hemos podido concluir un proyecto más, hablando en plural por todas las personas involucradas en este trabajo, desde mi directos y asesores hasta compañeros de maestría, que siempre tuve su apoyo, consejos y siempre supieron escuchar, como los doctores externos que me recibieron en sus Laboratorio GRACIAS. Es un trabajo que no solo lo hace una persona, lo hace todo un equipo atrás de este nombre. A CONACYT por permitirme colaborar con su plataforma y ayudarme en el sustento económico como en la estancia permitida. A PRODEP por su apoyo financiero para poder realizar este proyecto.

Personalmente agradecer a Dios quien siempre ha sido mi impulso a seguir adelante, inclusive cuando he querido renunciar, él me recuerda porque razón inicie el proyecto. A mis padres, mi padre eternamente en el cielo, al cual le prometí terminar, siendo parte de mis sueños, a mi madre y hermana porque a pesar del duro año que vivimos, siempre estuvimos apoyando. Mi pareja siempre eternamente agradecida por comprenderme y escucharme en mis momentos de frustración y alegría, por apoyarme en cada paso que doy e ir conmigo.



DEDICATORIAS

A mis padres y papa, Obidio Becerra por ser uno de los pilares fundamentales por lo que soy el día de hoy y siempre enseñarme a no renunciar a mis sueños, su apoyo incondicional en esta etapa fue de las principales motivaciones a seguir y quien dejo este mundo a mitad de mi sueño, pero me pidió que terminara todo lo que iniciaría y le echara muchas ganas a este proyecto, esto va dedicado a ti, hasta el cielo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIAS	5
INDICE DE FIGURAS	10
INDICE DE TABLAS	11
1.- INTRODUCCIÓN	16
1.1 Hipótesis	17
1.2 OBJETIVOS.....	17
1.2.1 Objetivo General	17
1.2.2 Objetivos específicos	17
2 ANTECEDENTES	18
2.1 Enfermedad de Chagas: agente causal, transmisión y ciclo de vida.	18
2.2 <i>Trypanosma cruzi</i> : Morfología y Características.	21
2.2.1 Estadios de <i>Trypanosma cruzi</i>	25
2.3 Manifestaciones Clínicas	28
2.4 Epidemiología	29

2.5 Tratamiento farmacológico	32
2.5.1 Mecanismo de acción (benznidazol y nifurtimox)	33
2.6 Nuevas alternativas de tratamiento.....	35
2.6.1 Mecanismo de acción de las naftoquinonas	38
3 Materiales y Métodos.....	40
3.1 Síntesis de derivados de 1,4-naftoquinonas	40
3.2 Lugar donde se realizaron las evaluaciones de los derivados de 1,4-naftoquinonas.....	42
3.3 Evaluación <i>in vitro</i> de los nuevos derivados de 1,4-naftoquinonas sobre epimastigote.	43
3.3.1 Condiciones de cultivo de epimastigote de <i>T.cruzi</i>	43
3.3.2 Solución Stock y diluciones seriadas de los compuestos derivados de 1,4-naftoquinona.....	43
3.3.3 Evaluación <i>in vitro</i> de epimastigote.....	43
3.4 Evaluación <i>ex-vivo</i> de tripomastigote.....	45
3.4.1 Condiciones de cultivo de tripomastigote.	45

3.4.2 Evaluación <i>ex –vivo</i> de tripomastigote en cepa INC-5 y NINOA.	45
3.5 Citotoxicidad inespecífica de los derivados de 1-4 naftoquinonas en macrófagos murino J774 y células hepáticas murina de hepatocito BpRc1 (ATCC® CRL-2217 TM) con ensayo de viabilidad celular con MTT.	47
3.5.1 Condiciones de Cultivo de la línea celular murina de hepatocito BpRc1 (ATCC® CRL-2217 TM).	47
3.5.2 Evaluación de citotoxicidad en línea celular murina de hepatocitos BpRc1 (ATCC® CRL-2217 TM).	47
3.6 Ensayo <i>in silico</i>	50
4 Análisis estadístico	50
5 Resultados	51
5.1 Obtención de Porcentaje de inhibición de crecimiento e IC ₅₀ de 1,4-naftoquinonas sobre epimastigote.	51
5.1.1 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria en <i>t.cruzi</i> .	53
5.2 Evaluación de tripomastigote en cepa INC-5 y NINOA.	55
5.3 Citotoxicidad en Hepatocitos BpRc1 (ATCC® CRL-2217 TM)	57
5.4 Citotoxicidad en macrófagos murino J774	59

5.5 Modelo farmacofórico	60
5.5.1 Evaluación de las hipótesis farmacofóricas	61
5.5.1.1 Modelo en epimastigote (Cepa INC-5)	61
5.5.1.2 Modelo en epimastigote (Cepa NINOA)	63
5.5.2 Modelo en tripomastigote - Cepa INC-5 y NINOA	65
6 Discusión.....	67
6.1 Evaluación <i>in vitro</i> de los derivados de 1,4-naftoquinoas en epimastigote.....	67
6.2 Evaluación <i>ex vivo</i> tripomastigote en cepa INC-5 y NINOA.	73
6.3 Citotoxicidad en macrófagos murino y hepatocitos.....	74
7 Conclusión.....	76
Bibliografía.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 CICLO BIOLÓGICO. REPLICACIÓN DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EN HUÉSPED VERTEBRADO A INVERTEBRADO	20
FIGURA 2 ESTRUCTURA DE EPIMASTIGOTE DE T. CRUZI.	26
FIGURA 3 ESTRUCTURA DE TRIPOMASTIGOTE DE T. CRUZI.	27
FIGURA 4 ESTRUCTURA DE AMASTIGOTE DE T. CRUZI	28
FIGURA 5 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DE LAS QUINONAS.	35
FIGURA 6 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE NAFTOQUINONAS..	36
FIGURA 7 ESQUEMA DE DERIVATIZACIÓN COMBINATORIA DE NAFTOQUINONAS.	37
FIGURA 8 ESQUEMA REPRESENTATIVO DEL METABOLISMO DE LA QUINONA, CICLO REDOX Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS ELECTROFILICOS.	39
FIGURA 9 ESQUEMA REPRESENTATIVA DE LA ESTRUCTURA DE LA 1,4- NAFTOQUINONA CON SUS DIVERSOS GRUPOS A EVALUAR.....	40
FIGURA 10 COMPUESTO DERIVADOS DE 1,4-NAFTOQUINONAS A EVALUAR..	41

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I REPRESENTACIÓN DE LOS 9 COMPUESTOS A EVALUAR CON SUS DIFERENTES GRUPOS LOCALIZADOS EN LA ESTRUCTURA DE LA 1,4-NAFTOQUINONA.	40
TABLA II PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO SOBRE EPIMASTIGOTE A 10 μM.	52
TABLA III. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL 50% DE PARÁSITOS (IC50) EN CEPA INC-5 Y NINOA DE EPIMASTIGOTE DE <i>T.CRUZI</i> (MEDIA + DE)	54
TABLA IV RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN LETAL DEL 50% DE PARÁSITOS DE TRIPOMASIGOTE.	56
TABLA VI RESULTADOS DE LOS DERIVADOS EN SERIE I EN EVALUACIÓN IN VITRO EN EPIMASTIGOTE. LOS DOS COMPUESTOS FUERON AGRUPADOS POR TENER UN HIDROGENO EN SU ESTRUCTURA QUINONICA Y UN GRUPO METIL CH₃ COMO UN GRUPO CLORO (CL).....	69
TABLA VII RESULTADOS DE LOS DERIVADOS DE 1,4-NAFTOQUINONAS EN SERIE II EN EVALUACIÓN IN VITRO EN EPIMASTIGOTE. LA SERIE II SE DERIVA POR EL GRUPO HALOGENADO CL ANCLADO EN DIFERENTES PARTES DE LA ESTRUCTURA DE LA NAFTOQUINONAS, ASÍ COMO EL GRUPO NITRO NO₂ Y METIL CH₃.	70
TABLA VIII RESULTADOS DE LOS DERIVADOS DE 1,4-NAFTOQUINONAS EN SERIE III EN EVALUACIÓN IN VITRO EN EPIMASTIGOTE. LA SERIE III ESTÁ CONFORMADO POR UN GRUPO HALOGENADO BR ANCLADO AL NÚCLEO DE LA ESTRUCTURA NAFTOQUINONAS DONDE SE AGRUPAN GRUPO NO₂ Y CH₃ Y EN UNO EL GRUPO CL.	71

NOMENCLATURA

Abreviatura	Definición
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BHI	Medio de infusión cerebro-corazón (Brain-Heart infusión)
Br	Bromo
Bzl	Benznidazol
CH ₃	Grupo metilo
CL ₅₀	Concentración letal del 50% de los parásitos
Cl	Cloro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTU	Unidad de Tipificación Discreta (Discrete Tryping Units)
eCh	Enfermedad de Chagas
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50 % de parásitos
kADN	Kinetoplasto de ácido desoxirribonucleico

mM	Milimolar
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido
Nfx	Nifurtimox
NTR	Nitrorreductasa
NO ₂	Grupo nitro
PIC	Porcentaje de inhibición de crecimiento
SOD	Superoxido Dismutasa
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
μl	Microlitros
μM	Micromolar

Resumen:

El tratamiento farmacológico para la enfermedad de Chagas actualmente son dos fármacos benznidazol (bzl) y nifurtimox (nfx), ambos fármacos en la fase crónica de la enfermedad generan efectos adversos, es por ello que el trabajo de maestría se centra en encontrar nuevos potenciales terapéuticos que sean eficaces en las formas morfológicas de *Trypanosoma cruzi*, responsable de la enfermedad de Chagas. Se trabajó con una síntesis de 9 derivados de 1,4-naftoquinonas, las cuales confieren múltiples procesos oxidativos biológicos. La actividad en la evaluación *in vitro* se observó que la mayoría de los compuestos eran activos sobre la fase de epimastigote. El compuesto Ce-Q9 ($0.04 \mu\text{M} \pm 0.02$) fue el que destacó en la cepa INC-5 y el compuesto Ce-Q11 ($1.14 \mu\text{M} \pm 0.03$) en cepa NINOA, a diferencia del fármaco de referencia: nfx. Se realizó ensayos *ex-vivo* en tripomastigote, en donde el compuesto Ce-Q11 tuvo un CL_{50} ($20.01 \mu\text{M}$) en la cepa NINOA, siendo mejor que los fármacos de referencia (nfx y bzl). La evaluación de citotoxicidad fue realizada en 2 líneas celulares, en ambas se observó que no existe citotoxicidad a diferentes concentraciones, en el compuesto Ce-Q8 en línea de hepatocitos, en las 3 concentraciones compartió una toxicidad no mayor al 25 % y como complemento se decidió hacer ensayos *in silico* mediante el modelo farmacofórico, donde los dos grupos halogenados (Bromo y cloro) favorecieron su actividad, beneficiando posiblemente la lipofilia del compuesto. A partir de estos resultados, se puede conjeturar que la incorporación en el grupo quinona de los grupos halogenados ayuda a que aumente la actividad biológica.

Abstract:

The pharmacological treatment for Chagas disease is currently two drugs: benznidazole (bzl) and nifurtimox (nfx), in the chronic phase of the disease both drugs cause adverse effects, which is why the master's work is focused on finding new therapeutic potentials that are effective in the morphological forms of *Trypanosoma cruzi*, responsible for Chagas disease. We worked with a synthesis of 9 derivatives of 1,4-naphthoquinones, which confer multiple biological oxidation processes. The activity in the *in vitro* evaluation showed that most of the compounds were active on the epimastigote phase. The compound Ce-Q9 ($0.04 \mu\text{M} \pm 0.02$) was the one that stood out in strain INC-5 and compound Ce-Q11 ($1.14 \mu\text{M} \pm 0.03$) in NINOA strain, unlike the reference drug: nfx. *Ex vivo* assays were carried out in trypomastigote, in which the compound Ce-Q11 had a CL_{50} ($20.01 \mu\text{M}$) in NINOA strain is better than the reference drugs (nfx and bzl). The evaluation of cytotoxicity was carried out in 2 cell lines, in both it was observed that there is no cytotoxicity at different concentrations, in the compound Ce-Q8 in line of hepatocytes in the 3 concentrations shared a toxicity not greater than 25% and as a complement was decided make *in silico* trials using the pharmacophoric model, where the two halogenated groups (Bromine and chlorine) favored their activity, possibly benefiting the lipophilicity of the compound. From these results, it can be conjectured that the incorporation in the quinone group of the halogenated groups helps to increase the biological activity.

1.- INTRODUCCIÓN

La Salud Pública es considerada como un área vinculada con la medicina humana, que se encarga de resguardar la Salud a nivel poblacional, en los últimos años se ha visto la necesidad que sea vinculada con Medicina Veterinaria debido a la intervención de enfermedades transmisibles del hombre a partir de los animales, con este problema ha surgido la necesidad de denominarlo como “Una Sola Salud” la cual está ligado a la protección de la Salud Pública para la prevención y control de patógenos en las poblaciones con el interfaz entre el hombre, el animal y el medio ambiente, ayudando a prevenir la transmisión de enfermedades. Los animales de compañía y fauna silvestre en esta rama han demostrado ser un gran factor de riesgo para la dispersión de diversas enfermedades, uno de los ejemplos es; las enfermedades parasitarias.

La Tripanosomiasis Americana también conocida como enfermedad de Chagas (eCH) es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que cuenta con un ciclo de vida complejo. La gran problemática de eCh es el tratamiento actual, donde se conoce 2 fármacos utilizados en línea humana: nifurtimox (nfx) y benznidazol (bzl), que tienen actividad farmacológica solo en fase aguda de la enfermedad pero en fase crónica generan efectos adversos, por lo que esta investigación se centra en probar nuevas alternativas terapéuticas que nos proporcione un fármaco eficaz sobre las formas de tripomastigote y amastigote, que son las dos fases de *T. cruzi* que afecta al mamífero. (Castillo-garrit *et al.*, 2011)(Esch & Petersen, 2013).

1.1 Hipótesis

Los derivados de 1,4-naftoquinonas tienen una alta actividad tripanosomicida sobre las formas morfológicas de epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi* a diferencia de los tratamientos actuales, debido a la colocación de los grupos halogenados que ayudan a mejorar la actividad biológica como una baja citotoxicidad en una línea celular de hepatocitos y macrófagos murinos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Evaluar la actividad biológica de nuevos derivados de 1,4- naftoquinonas sobre dos fases de *Trypanosoma cruzi*: tripomastigote por método *ex –vivo* y epimastigote por método *in vitro*, como también saber el grado de toxicidad en dos líneas celulares.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* la actividad biológica de las 1,4 naftoquinonas sobre epimastigote de *T. cruzi* para obtener el IC₅₀ de cada compuesto en: cepa INC-5 y NINOA.
2. Establecer por método *ex-vivo* un DL₅₀ en tripomastigote de *T. cruzi* en cepa INC-5 y NINOA.
3. Evaluar la toxicidad de los compuestos 1,4-naftoquinonas en 2 líneas celulares: macrófagos murinos J774 y hepatocitos BpRc1 (ATCC® CRL-2217™).

4. Realizar estudios *in silico* de relación estructura-actividad tripanosomicida de las nuevas 1,4-naftoquinonas por farmacóforo.

2 ANTECEDENTES

2.1 Enfermedad de Chagas: agente causal, transmisión y ciclo de vida.

La Tripanosomiasis Americana también conocida como enfermedad de Chagas (eCH) es considerada una enfermedad zoonótica que fue por primera vez descrita en Brasil en 1909 por Carlos Chagas y se ha extendido por toda América Latina hasta llegar a Estados Unidos. La eCh es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, que cuenta con un ciclo de vida complejo y caracterizado por varias formas de desarrollo presentes en huéspedes vertebrados e invertebrados, demostrando que puede infectar a más de 180 especies de mamíferos. En el caso de las aves se ha encontrado que son resistentes a la infección (Esch & Petersen, 2013).

La transmisión de la eCh está dada por diversas vías, la principal es la vectorial que es por medio de un vector hematófago de la subfamilia *Triatominae* y ha sido clasificado, de acuerdo a la adaptación a la vivienda humana, en 3 categorías: doméstico, peri-doméstico y silvestre, donde se han encontrado a más de 136 especies de Triatomíneos diseminados por el continente Americano, los principales para la población humana son: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma brasiliensis* y *Triatoma sordida*, existen vías que no hay que dejarlas a

un lado, como: transfusión sanguínea, vía congénita, trasplante de órganos y una última que se ha detectado en la última década; por ingesta de alimentos contaminados, donde ha sido informado que es debido por aplastamiento de insectos infectados entre frutas y plantas (García-jordán, Berrizbeitia, & Concepción, 2015) (Teixeira, *et al.*, 2011).

El ciclo biológico de *T. cruzi* (Figura 1) empieza cuando el insecto vector se alimenta de la sangre del huésped y transmite el parásito de en fase de tripomastigote metacíclico por medio de sus heces que deja al momento de alimentarse, el cual puede entrar a través de la herida o membrana de mucosa intacta como la conjuntiva del ojo (Romaña) y tracto intestinal. Una vez dentro del huésped, invaden diferentes tipos de células fagocíticas y no fagocíticas, donde se diferencian en amastigote intracelular y se multiplica por fisión binaria dentro de vacuolas paraísofóforas, escapando al citoplasma y ocasionando la lisis de la célula, para diferenciarse en tripomastigote en la matriz extracelular y salir a circulación sanguínea. Durante la fase inicial de replicación, infiltra células T que pueden tardar de 10 a 12 días, lo que hace al parásito capaz de sobrevivir en el organismo y una vez que salga al torrente sanguíneo pueden invadir otras células del huésped y transformar nuevos sitios de infección, donde puede invadir y generar tropismo en miocitos lisos y cardíacos como en el tracto gastrointestinal. La replicación se reanuda cuando los parásitos son ingeridos por otro vector, que se alimenta del huésped vertebrado infectado, de esta manera ingieren los tripomastigote que pasarán a intestino medio del vector y se diferenciarán en epimastigote y harán su replicación en intestino

grueso del vector y por último; serán excretados en heces, donde comienza el ciclo biológico de nuevo y pueda ser mantenido en ambientes selváticos como urbanos la importancia que se encuentre un triatónimo dentro de casa es debido a que es fácil que se alimente de cualquier mamífero que habite en un mismo lugar ayudando a que persista la enfermedad y el ciclo biológico pueda avanzar y se propague (Carabarin, *et al.*, 2011) (Esch & Petersen, 2013).

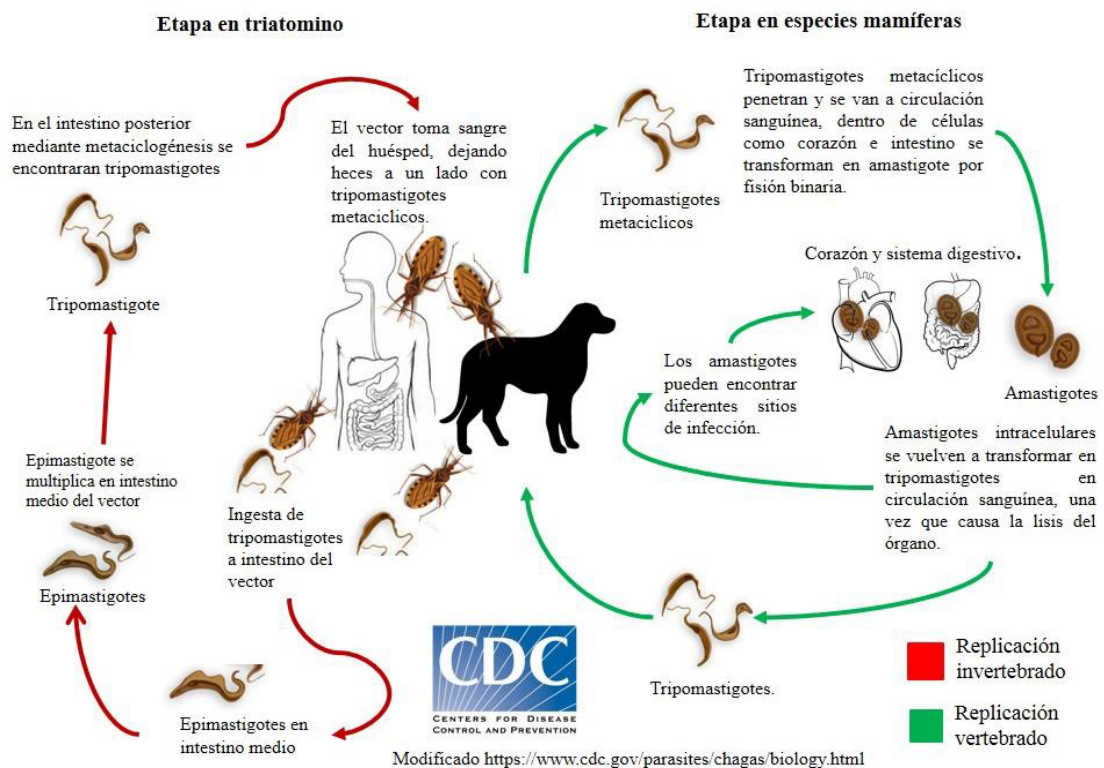


Figura 1 Ciclo Biológico. Replicación de *Trypanosoma cruzi* en huésped vertebrado a invertebrado. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.

La infección empieza a partir de la picadura de un triatónimo al ser humano o una especie mamífera; como el perro, donde la mayoría de especies mamíferas presentan solo 2 estadios: tripomastigote y amastigote, a excepción de marsupiales que se ha reportado que pueden almacenar los 3 estadios de *T. cruzi* (amastigote, tripomastigote y epimastigote). En el caso del triatónimo su ciclo empieza a partir de la ingesta de tripomastigotes metacíclicos en su organismo en donde se diferencia en epimastigote en su intestino medio y realiza la metacicloogénesis, donde se haya en el momento que el triatónimo se alimente de su huésped y deje a un lado las heces con tripomastigotes y el mamífero al generar comezón se rasca y

alado de la herida donde ingiere el triatomino se encuentran las heces, lo arrastra y entra al organismo a invadir.

2.2 *Trypanosoma cruzi*: Morfología y características.

La membrana plasmática de *T. cruzi* está compuesta por una bicapa lipídica con diversas proteínas. El citoplasma de *T. cruzi* presenta diferentes organelos como (De Souza, 2009)(Vianna Martins *et al.*, 2012):

1. El cinetoplasto (k-ADN): se encuentra en el cuerpo basal conectado por estructuras filamentosas desde el cinetoplástido hasta el cuerpo basal, definiendo la región celular y el origen del flagelo, donde cerca del área se ha descubierto una proteína designada; p166, se ha sugerido que estas proteínas pueden neutralizar las moléculas de ADN de carga negativa. El k-ADN se componen de dos tipos de anillos de ADN presentes como: minicírculos y maxicírculos que varían de tamaño desde 0.5-2.5 kb (dependiendo de las especies). Los minicírculos permiten la replicación adicional y su reintegración a la red por la acción de enzimas conocidas como topoisomerasas, representando el 95% de las moléculas. Los maxicírculos son heterogéneos en la secuenciación, funcionalmente son análogos al ADN mitocondrial en eucariotas que codifican los ARNr. La principal función es codificar las enzimas de la cadena respiratoria como ATPasa y citoxocomoxidasa y se consideran verdaderos representantes de ADN mitocondrial, mientras que los minicírculos parecen codificar los ácidos ribonucleicos de guía (ARNg) necesarios para la edición de ARN mitocondrial, que en asociación con

los minicírculos tiene una función similar a la de los maxicírculos en la codificación de la información genética necesaria para la edición de ARN.

2. El cinetosoma: también denominado cuerpo basal siendo la continuación alada del flagelo.
3. Los glicosomas: estructuras esféricas o alargadas rodeada por una membrana homogénea denominado microcorpúsculos, el cual contiene enzima como la catalasa, que en el caso de las células de mamíferos, es una enzima involucrada en la degradación del peróxido de hidrógeno formando reacciones metabólicas, siendo por esta razón denominada peroxidasa. Sin embargo, a diferencia de la estructura de las células de los mamíferos, la principal característica específica que da nombre en el organismo en tripanosomátidos es la presencia de enzimas de glucólisis. El glicosoma no posee un genoma. Por lo tanto, todas las proteínas encontradas en él están codificadas por genes nucleares, traducidas en ribosomas libres e importadas post-traduccionamente en el orgánulo
4. El flagelo: formado por nueve pares de microtúbulos en un círculo junto con dos microtúbulos centrales, todos inmersos en una matriz citoplásmica rodeada por una membrana celular en su extensión completa, que se presenta en la región donde se implanta el cuerpo celular, una invaginación llamada bolsillo flagelar.
5. Estructura Golgi: similar al aparato de Golgi en mamíferos, el cual su función es participar en la glicosilación de proteínas y tráfico de membranas.

6. El citostoma: parece estar especializado en la evaginación de la membrana plasmática que penetra en el cuerpo celular y participa en la actividad endocítica; especialmente en epimastigotes, el citostoma es responsable de aproximadamente el 85% de la endocitosis total.
7. Bolsillo flagelar: estructura localizada en la base del flagelo y es el responsable de diversas actividades como endocíticas y exocíticas.
8. Reservosomas: se describen como un grupo de monocapas redondeadas o con estructuras irregulares que contienen varias inclusiones en su matriz. Se concentran en la región posterior de los parásitos y desaparecen durante la transformación de los epimastigotes en tripomastigotes. Tienen proteasas y acumulan proteínas a partir de la endocitosis.
9. El acidocalcisoma: se encontraron estructuras vacuolares que contenían depósitos densos en electrones. Estos fueron designados como gránulos de poli fosfato o gránulos de volutina. Hasta 1994, no se demostró que fuera un orgánulo capaz de transportar protones y calcio, en lo sucesivo se denominó acidocalcisoma, Además participan en homeostasis y osmorregulación de pH.

T. cruzi cuenta con diversas enzimas metabólicas como transialidasa y cruzipaína pero también cuenta con vías metabólicas únicas (ARN trans-empalme) o como proteínas compartidas con otros, debido a que su reproducción es de manera asexual tanto en huéspedes vertebrados como invertebrados, se cree que tiene una población clonal con una alta diversidad

reflejada por sus isoenzimas y sus genes codificantes (Bermudez, Davies, Simonazzi, Pablo Real, & Palma, 2016).

El desarrollo de la eCH varía considerablemente y hay diferencias entre individuos y localidades geográficas, debido a que *T. cruzi* es una especie genéticamente muy diversa y heterogénea, compuesto por diversas cepas que circulan en la naturaleza con variabilidad genética, donde la principal propuesta biológica de *T. cruzi* fue descrita por Brenner (1977) quien describió la cepa Y y CL como cepas polares, representantes de la variabilidad intraespecífica sustancial del protozoario. Recientemente, los principales criterios utilizados en la caracterización de las diversas cepas de *T. cruzi* incluyen; haplotipos, unidades de tipificación discretas (DTU), ADN ribosomal, esquizodemas, zimodemas, biodemas, sensibilidad a los quimioterapéuticos, virulencia y patogenicidad, clínica y patológica.

T. cruzi está clasificada en seis grupos genéticos, conocidos como unidades de tipificación discretas (DTU): (*T. cruzi* I a *T. cruzi* VI) TcI a TcVI, definido como; "un conjunto de poblaciones que son genéticamente más similares entre sí que a cualquier otra población y son identificas por marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos, que constituyen unidades relevantes para la epidemiología molecular y la evolución experimental", donde cada uno cuenta con distintas propiedades biológicas, como la infecundidad, el tropismo tisular y la susceptibilidad a los medicamentos. Estas características deben tenerse en cuenta cuando se realizan experimentos con nuevas drogas

porque las diferencias (DTU) muestran variaciones en la expresión y la actividad de algunas enzimas metabólicas (Bermudez *et al.*, 2016) (Moraes & Franco, 2016). Se supone que las cepas o aislados de parásitos obtenidos de mamíferos o vectores son entidades multiclonales, y sus relaciones filogenéticas tienen un impacto en la diversidad de los parásitos y las características biológicas (Oliveira *et al.*, 1998).

2.2.1 Estadios de *Trypanosoma cruzi*.

Epimastigote (Figura N°2) (D. E. Teixeira, Benchimol, Crepaldi, & de Souza, 2012): es una célula que presenta un flagelo anterior, teniendo un conjunto organizado de microtúbulos estables y poco espaciados debajo de la membrana del cuerpo celular. Los epimastigotes absorben sus nutrientes mediante la endocitosis de macromoléculas del medio extracelular. Son células polarizadas con un flagelo anterior, el citotoma se abre cerca del bolsillo flagelar e invagina formando la citofaringe que es acompañada de 4 microtúbulos, donde se han observado vesículas endocíticas que contenían peroxidasa, transferrina, LDL (lipoproteína de baja densidad) o albumina de la bolsa flagelar o al extremo distal de la citofaringe. Localizando también enodosomas tardíos, ricos en cruzipaina y con un pH luminal alrededor de 6.0. (Porto-Carreiro *et al.*, 2000). Presenta un cinetoplasto anterior al núcleo y una membrana ondulada poco desarrollada que mide entre 20 y 40 μm , incluido el flagelo libre. El nucléolo es esférico, generalmente ocupando una posición central. El parásito presenta una movilidad debido al movimiento del flagelo,

teniendo una intensa actividad replicativa por división binaria longitudinal y muchas veces de forma rosácea. Esta forma evolutiva no resiste la temperatura de 37 ° C siendo en un mejor desarrollo de 20-28 °C (Vianna Martins *et al.*, 2012).

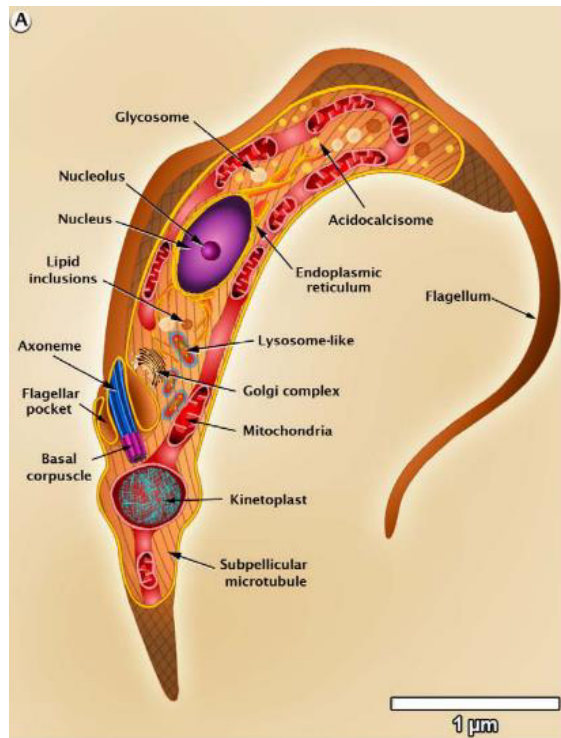


Figura 2 Estructura de epimastigote de *T.cruzi*. (D. E. Teixeira *et al.*, 2012)

Tripomastigote (Figura N°3) (D. E. Teixeira *et al.*, 2012) : el estadio no es capaz de replicarse y se puede encontrar tanto en huésped vertebrado como invertebrado, siendo tripomastigote metacíclico en el primero y sanguínea en el segundo. Son formas delgadas que miden aproximadamente 17 µm, presentando un núcleo grande y central como un cinetoplasto de alta cantidad de ADN en la porción terminal. El flagelo emerge del corpúsculo basal cerca del

cinetoplásto y es largo. La membrana ondulante es estrecha mide entre 12 y 20 μm (Vianna Martins *et al.*, 2012).

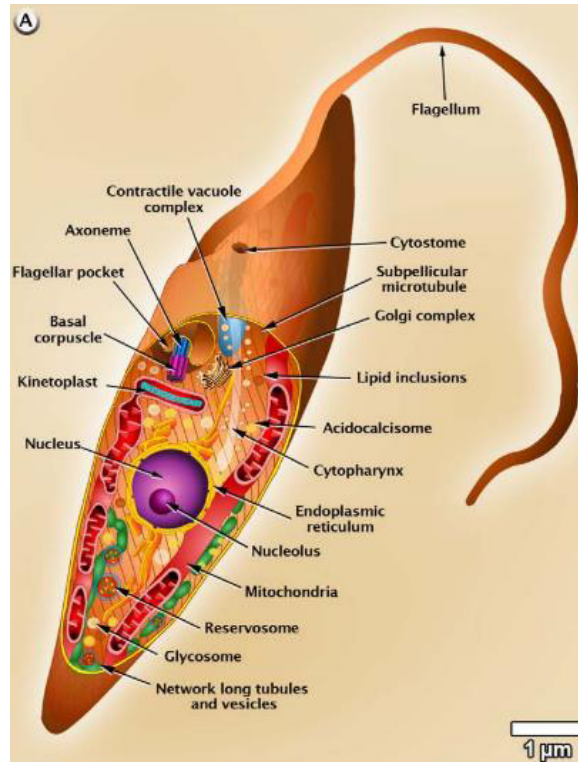


Figura 3 Estructura de Tripomastigote de *T.cruzi*. (D. E. Teixeira et al., 2012)

Amastigote: su forma es diferenciada a los otros dos estadios, siendo de forma intracelular y carecer de un flagelo exterior como una membrana ondulada. Su movimiento se caracteriza por rotación y mide aproximadamente 4.0 μm (entre 2.0 y 6.5 μm) de diámetro. Su reproducción es por fisión binaria longitudinal cada 12 horas, transformándose en el tripomastigote sanguíneo aproximadamente de 11 a 13 horas antes de la ruptura celular. Las formas

amastigotes, cuando se liberan en la circulación, también son capaces de infectar nuevas células como corazón e intestinos(Vianna Martins *et al.*, 2012).

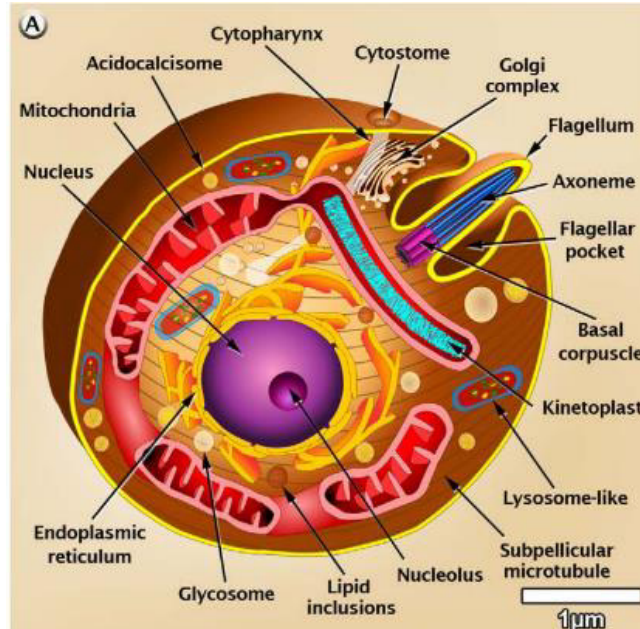


Figura 4 Estructura de amastigote de *T. cruzi*. (D. E. Teixeira *et al.*, 2012)

2.3 Manifestaciones Clínicas

Los signos y síntomas en huéspedes silvestres y domésticos infectados con eCH suelen ser similar al desarrollo de la enfermedad en el humano, donde existe una fase aguda y crónica, produciendo un daño que puede permanecer por años o inclusive décadas. En conejos, perros, gatos, ratas y conejillos de india infectados con *T. cruzi* se ha observado: desarrollo de insuficiencia cardíaca, cianosis, edema, hidrotórax e hidropericardio, como también ha sido descrita alteraciones como; bradicardia, arritmias y muriendo por insuficiencia cardíaca. En el caso de perros se ha tenido bien estudiado la infección aguda en jóvenes que presentan: miocarditis con arritmia en la fase crónica, los perros

presentan una insuficiencia cardíaca progresiva crónica o insuficiencia cardíaca congestiva bilateral o del lado derecho (A. R. L. Teixeira *et al.*, 2011) (Esch & Petersen, 2013).

2.4 Epidemiología

Actualmente la distribución de la enfermedad abarca el Norte, Centro y Sur de América, junto con Estados Unidos, donde existe una convivencia de vector triatomino y reserva de fauna silvestre, guiando la propagación de *T. cruzi*. Los animales domésticos como el perro (familia *Canidae*) y gato (familia *Felidae*) han demostrado tener altas prevalencias con la infección de *T. cruzi* de forma natural, siendo un gran factor de riesgo para la propagación de la enfermedad y participando en la transmisión peri-domiciliar y domiciliaria. En cuanto a fauna silvestre, los marsupiales procedentes del género *Didelphis* (*Marsupialia: Didelphidae*) son considerados como los primeros hospedadores y reservorios de *T. cruzi* en Sudamérica, como es el caso del tlacuache y la zarigüeya, donde se ha estudiado que son capaces de mantener las 3 fases de la enfermedad (epimastigote, tripomastigote y amastigote) en las glándulas anales, como en las zarigüeyas que también han jugado un papel importante para la propagación de la enfermedad debido a su interacción con el triatomino directo en su hábitat normal, dando hincapié a la contaminación en el medio ambiente y por consiguiente, el consumo de carne cruda entre animales o en el caso del humano al momento de no cocinar bien la carne y consumirla (A. R. L. Teixeira *et al.*, 2011) (Bermudez *et al.*, 2016).

En la Universidad de A&M en Texas, se observó el desarrollo de la enfermedad cardíaca en la fauna infectada, como es: mapache (*Procyon lotor*), coyote (*Canis latrans*), zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*) y gato montés (*Lynx rufus*), donde se encontró que los mapaches eran positivos a *T. cruzi* con el tipo de DTU: (*T. cruzi* IV) TcIV y de ese mismo grupo confirmado, solo un mapache portaba ambos tipos de DTU: (*T. cruzi* I) TcI y (*T. cruzi* IV) TcIV, concluyendo que los mapaches, siendo especies mamíferas habitando en el mismo lugar que el triatomino son un foco de infección para que *T. cruzi* pueda mantenerse y el ciclo biológico continúe (Curtis-Robles, Lewis, & Hamer, 2016).

Las aves han sido reportadas como fuente de infección de *T. cruzi*, se ha visto presente en la eclosión, pero la infección se encuentra mediante la inoculación de tripomastigotes de *T. cruzi* infecciosos en la cámara de aire de huevos de gallina fértil, los cuales se dividen en amastigotes y se pueden ver en las células de embrión al día 8 de crecimiento, donde el mecanismo del sistema inmune innato elimina la infección y están libres de parásitos, pero por lo tanto esto no significa que el triatomino que se alimente de las aves sea un impedimento para la infección hacia el humano (A. R. L. Teixeira *et al.*, 2011).

La distribución en la República Mexicana ha abarcado estados como: Jalisco, Morelos, Campeche y Yucatán, como zonas endémicas. En el estado de Campeche se ha reportado la prevalencia de seropositividad de *T. cruzi* siendo más alta en perros que en personas, con 9.5 % de positividad en perros callejeros y 5.3 % de positividad en perros de propiedad, en el caso del gato es

menor la prevalencia. Yucatán ha sido reportada como zona endémica, afectando en su mayoría a perros y humanos, donde se ha observado que los triatominos prefieren alimentarse de los perros quienes han sido reportados como agentes reservorios del parásito y su resultado en estudios de prevalencia revelan que los perros geriátricos a comparación de los jóvenes son los más afectados y que debido a la adaptación del vector se propaga tanto en zonas rurales y urbanas, donde el *T. dimidiata* ya está establecido en Mérida, Yucatán. En un estudio en el municipio de Allende, Nuevo León, confirmaron que de 118 muestras del vector *T. gerstaeckeri* solo 37 (43 %) fueron positivas a *T. cruzi* (Esch & Petersen, 2013) (Molina-Garza, *et al.*, 2015) (Jiménez-Coello, *et al.*, 2015).

Respecto al área del norte de México, en el estado de Nuevo León en el 2017, el Dr. Galaviz y colaboradores realizaron un estudio en 3 diferentes áreas; rural, sub-urbana y urbana, obteniendo resultados de prevalencia de un 14,5 % del total de las muestras: con un 32 % en zorrillos y de 15 % en perros domésticos, aclarando que las muestras no fueron homogéneas, en este último se diagnosticaron con los signos clínicos más frecuentes como es: miocarditis, arritmia, anorexia y muerte súbita en cachorros menores de un año, desarrollando los signos similares al humano, también se encontró que el triatomino *T. gerstaeckeri* está asociado a *Neotoma micropus*, el cual se encontraba infectada de forma natural con *T. cruzi* (33%-59.6%), identificando a nivel de genotipificación que el *T. cruzi I* es el que se distribuye por vectores

triatominos y se asocia con ciclos selváticos y domésticos (Galaviz-silva, et al, 2017).

2.5 Tratamiento farmacológico

Para el tratamiento de la eCH en el humano está registrado desde hace cuatro décadas dos fármacos aprobados para su uso; nfx (derivado de nitrofurano/(Lampit® Bayer) y bzl (derivado nitroimidazol/Ragonil, Rochagan®). Ambos fármacos comparten buenas características como; mejor tolerancia en los niños y mayor efectividad durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, donde existe evidencia documentada de que algunos DTU son naturalmente resistentes a los compuestos nitroheterocíclicos pero una vez que es aplicado en fase crónica llegan a generar efectos adversos como: neurotoxicidad, linfadenopatía por neuropatía periférica, agranulocitosis, púrpura, trombocitopenia, dolor articular, muscular y alteraciones dermatológicas. Por lo tanto, estos fármacos no llegan a tener gran efectividad contra el parásito debido a la diferencia genética tanto entre cepas como la variedad de DTU de *T.cruzi*, donde se le atribuye la información sobre la resistencia del parásito a los compuestos nitroheterocíclicos debido a esta diferencia entre poblaciones genéticas (Castillo-garrit *et al.*, 2011)(García-torres & Pérez-montfort, 2011)(Moraes & Franco, 2016) (Bermudez *et al.*, 2016). En el caso del bzl se ha encontrado que después de la aplicación en fase aguda, la eficacia en la eliminación de anticuerpos de *T. cruzi* es más eficaz en América del Sur que en

Centroamérica (Pérez-Molina, Perez, Norman, Monge-Maillo, & López-Vélez, 2015).

En Medicina Veterinaria no existe un tratamiento específico para animales domésticos. En Brasil se realizó un estudio con 30 caninos mestizos infectados con cepa Berenice-78 (*T.cruzi* II) con 4 meses de edad, con el objetivo de observar la carga de parásitos usando el tratamiento bzl y ver que mejoría alcanzaría a nivel del tejido muscular en la fase crónica, en donde realizaron 3 grupos; perro sanos, sin infectar y sin tratamiento. En los resultados de 30 días después el tratamiento se observó una marcada reducción de la carga parasitaria en el torrente sanguíneo; por medio de ensayo de hemocultivo. Los resultados de PCR arrojando resultados negativos del 82 % de los animales tratados, pero aun así un año después del tratamiento se detectó un aumento progresivo de parásitos en el torrente sanguíneo, lo que concluye que tanto en humanos como en especies mamíferas no existe un tratamiento eficaz que nos pueda ayudar a eliminar el parásito tanto en fase crónica como en aguda y sin tener efectos adversos (Santos *et al.*, 2016).

2.5.1 Mecanismo de acción (benidazol y nifurtimox)

Los tratamientos utilizados internacionalmente en humanos son compuestos nitroheterocíclicos que actúa por la reducción cíclica del grupo nitro por medio de la enzima superóxido dismutasa produciendo un radical de hidroxilo oxidante, que se oxida y forma un superóxido, generando el incremento de la producción de especies reactivas de oxígenos, donde genera

al estrés oxidativo del parásito. Wilkinson en 2008 propuso que la nitrorreductasa tipo I (NTR) es la principal enzima involucrada en el mecanismo de los fármacos nitroheterocíclicos en *T.cruzi* y *T.brucei*, esta vía produce un nitrilo insaturado de cadena abierta que muestra citotoxicidad equivalente tanto en células parasitarias como mamíferas (Bermúdez *et al.*, 2016), aún y conociendo los mecanismos, estos compuestos no se limita al parásito, llegando a afectar en misma proporción a las células mamíferas y generando efectos adversos (Sánchez, Vélez, Restrepo, Marín, & Gallego, 2016).

El mecanismo de acción de nfx involucra la producción de radicales libres, por medio de la vía de reducción del grupo nitro a radicales aniónicos inestables peróxido de hidrógeno y metabolitos electrofílicos, donde la reducción de nfx mediante la NTR frena el anillo de furano produciendo un nitrilo de cadena abierta insaturado que es tan tóxico que afectan a *T. cruzi*, siendo el parásito deficiente en mecanismos de detoxificación para metabolitos de oxígeno, particularmente peróxido de hidrógeno, lo que lo hace más susceptible al estrés oxidativo (Apt B *et al.*, 2008).

El bzl es un compuesto poco hidrosoluble que afecta directamente su biodisponibilidad. La baja solubilidad de bzl combinada con un tratamiento de dosis alta durante largo período de tiempo desencadena reacciones adversas, afectando la biodisponibilidad y disminuyendo la efectividad en fase crónica. Su mecanismo estado dado inhibiendo la NADH fumarato reductasa produciendo alteraciones en la cadena respiratoria, donde se cree que la toxicidad del bzl

aparece debido a la interacción de sus metabolitos reactivos con el ADN; proteínas y lípidos u otros componentes celulares relevantes. En estudios se ha encontrado que bzI se une a los tioles de bajo peso molecular y a proteínas que inactivan las enzimas cuyo sitio activo involucra residuos de cisteína, como el sistema de la tiroxina peroxidasa-triparoxina. También encontraron que BZL se unía covalentemente al ácido piroglutámico y a los residuos de valina. Por lo tanto, los autores propusieron un nuevo mecanismo de acción BZL, pero su vía exacta y las enzimas involucradas se descubrirán en experimentos futuros (Castro, 2013) (Bermudez *et al.*, 2016).

2.6 Nuevas alternativas de tratamiento

Las quinonas son compuestos que se encuentran distribuidos en la naturaleza, su clasificación depende de la estructura química de cada una de ellas y dentro de las cuales, las más frecuentes son: benzoquinonas (monocíclicas), naftoquinonas (bicíclicas) y atranquinonas (tricíclicas) como se muestra en la Figura N°5 (Leyva, 2016).

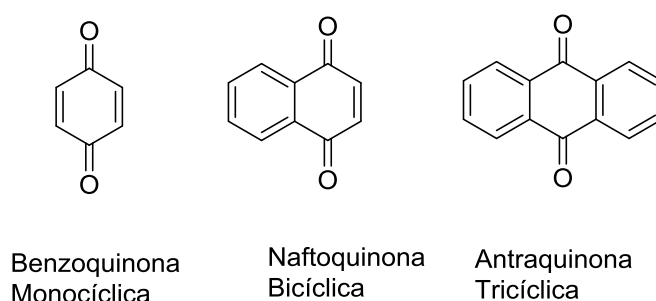


Figura 5 Clasificación y estructura de las quinonas. Se aprecian los diferentes derivados de quinonas que, dependiendo de la fase química, corresponden a la familia.

Las naftoquinonas pertenecen a compuestos carbonílicos (α,β -insaturados) siendo compuestos cíclicos derivados del naftaleno, su estructura consiste en dos anillos hexagonales fusionados que comparten un par de átomos de carbono y se caracteriza por tener dos grupos carbonilos en posición; 1,4-naftoquinonas y 1,2-naftoquinonas como se muestra en la Figura N°6 (Cantú González, Palomo Ligas, Nery Flores, López López, & Barajas Bermúdez, 2012).

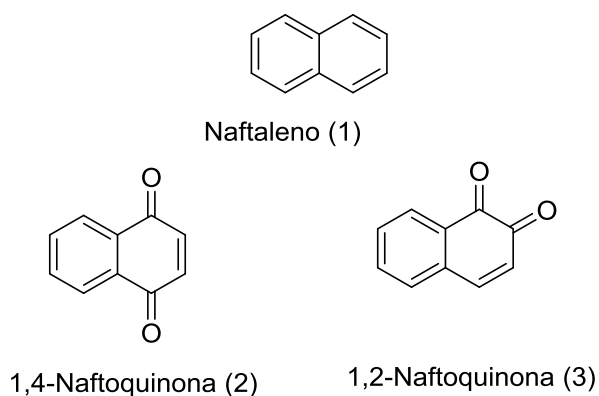


Figura 6 Estructura química de los diferentes grupos de naftoquinonas. Observar los dos grupos derivados de naftoquinonas, provenientes del grupo naftaleno.

En estudios actuales se ha trabajado con derivados de naftoquinonas que están presentes en varias plantas, como es el caso del Lapachol (α -lapachona y β -lapachona), que son aislados a partir del árbol de la familia *Bignoniaceae* (Cantú González *et al.*, 2012). En el 2008, Bolognesi y colaboradores, seleccionaron compuestos a partir de la estructura del lapachol (Figura N°7), donde seleccionaron la unidad de quinona como la estructura central para la derivatización combinatoria. Sobre la información obtenida de la actividad de lapachol, se seleccionó en la base los andamios naturales 1,4-naftoquinona y 1,4-antraquinona y se incorporó en la posición 2 el elemento estructural

denominado Triclosán, siendo reportado como un biocida que mata formas procíclicas del torrente sanguíneo de *T.brucei*. La pequeña librería fue evaluada contra *T. b. rhodesiense*, *T. cruzi*, y *L. donovan*. siendo realizada en la fase de amastigote de *T.cruzi*, donde la mayoría de compuestos sintetizados mostraron tener una actividad biológica más potente que su fármaco de referencia; bzl, en el caso de la librería con la estructura 1,4-naftoquinona (2-fenoxi-1,4-naftoquinona) mostró una buena actividad sobre el parásito, sin embargo, la actividad en una línea celular L6 resultó ser toxico, por lo tanto se vieron en la necesidad de seguir realizando más síntesis de compuestos o adicionar grupos para bajar la citotoxicidad y sea igual o más efectiva en la actividad biológica (Bolognesi, Lizzi, Perozzo, Brun, & Cavalli, 2008) (Leyva, 2016).

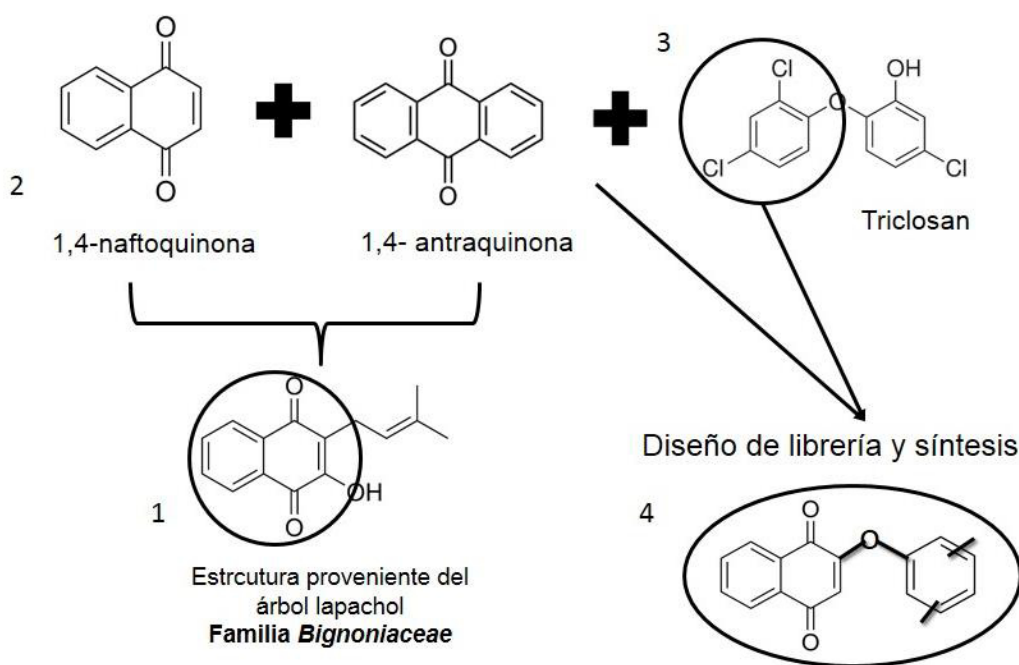


Figura 7 Esquema de derivatización combinatoria de naftoquinonas. El grupo de Bolognesi y colaboradores (2008) realizaron una pequeña librería a partir de la estructura proveniente del árbol lapachol, donde agregaron 2 andamios quinónicos (2) junto al triclosán (3) y a partir de la librería (4) lo evaluaron contra la fase de amastigote de *T. cruzi*.

La estructura lapachol (β -lapachone) ha sido investigada en Argentina y Brasil, donde se observó que los epimastigotes de *T.cruzi* con fracciones mitocondriales o microsomales, junto con NADH o NADPH, inducen la liberación del radical de anión superóxido y H_2O_2 , en el caso de la fases de amastigote y tripomastigote tuvieron resultados con la reordenación de la cromatina, alteración de las membranas nucleares y citoplasma, como la inflamación mitocondrial, como también la inhibición del ADN y ARN y en menor proporción la síntesis de proteínas (Pinto y De Castro, 2009).

2.6.1 Mecanismo de acción de las Naftoquinonas

Las naftoquinonas están involucradas en diversos procesos, siendo químicamente el producto de la oxidación de compuestos aromáticos para formar las dicetonas. Se ha observado que forman puentes de hidrógenos entre las quinonas y proteínas en sistemas biológico, siendo responsables de las propiedades redox, siendo por medio de procesos de óxido-reducción ya que tienen la capacidad de aceptar uno o dos electrones y formar un radical anión o dianión, donde esta propiedad dependerá directamente de la estructura química (Leyva, 2016).

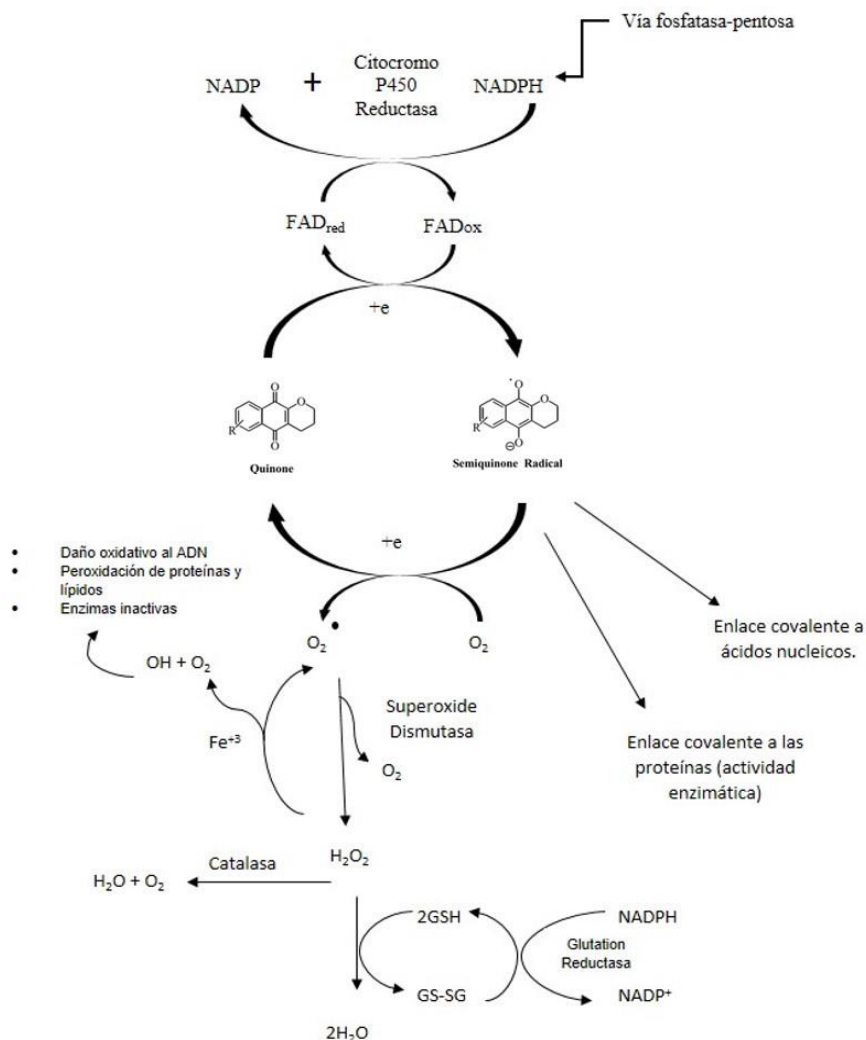


Figura 8 Esquema representativo del metabolismo de la quinona, ciclo redox y producción de metabolitos electrofilicos. El ciclo redox de las quinonas inicia con reducción de uno o dos electrones que son catalizados por enzimas como: NADPH-citocromo P450 reductasa, NADPH citocromo b5 reductasa o NADPH ubiquinona oxido reductasa, donde se producen semiquinonas inestables las cuales van a depender de diversos factores como: la concentración del sustrato, la actividad enzima-sustrato, temperatura, pH y del mismo potencial de la reducción de la quinona, la cual traspasa electrones al oxígeno molecular (O₂), regresando a su estructura quinoidal, generando un radical anión superóxido (O₂⁻) (Leyva, 2016). El oxígeno molecular (O₂) puede formarse en peróxido de hidrogeno (H₂O₂) a través de una reacción catalizada por el (SOD) superóxido dismutasa, seguido de la formación de un radical hidroxilo (OH[•]) mediante la reducción de peróxido catalizada por hierro a través de la reacción de Fenton, en el interior de la célula, donde el (H₂O₂) puede atribuir a la oxidación de ciertas biomoléculas, generando radicales libres. Todas estas especies altamente reactivas pueden reaccionar directamente con el ADN u otras macromoléculas celulares, como los lípidos y las proteínas, lo que daña las células (Pinto & De Castro, 2009) (Leyva, 2016).

3 Materiales y Métodos

3.1 Síntesis de derivados de 1,4-naftoquinonas

Los compuestos derivados de 1,4-naftoquinonas (Figura N° 9) fueron sintetizados en el Departamento de Química Orgánica de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

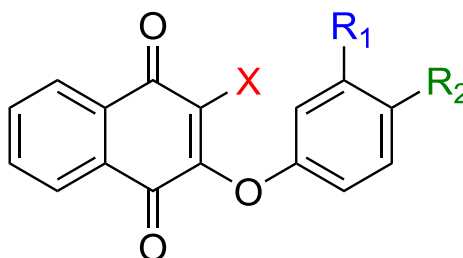


Figura 9 Esquema representativa de la estructura de la 1,4-naftoquinona con sus diversos grupos a evaluar.

COMPUESTOS	SUSTITUYENTES		
	X	R1	R2
Ce-Q2	H	NO ₂	CH ₃
Ce-Q3	H	NO ₂	Cl
Ce-Q5	Cl	CH ₃	NO ₂
Ce-Q6	Cl	NO ₂	CH ₃
Ce-Q7	Cl	NO ₂	Cl
Ce-Q8	Cl	H	NO ₂
Ce-Q9	Br	CH ₃	NO ₂
Ce-Q10	Br	NO ₂	CH ₃
Ce-Q11	Br	NO ₂	Cl

Tabla I Representación de los 9 compuestos a evaluar con sus diferentes grupos localizados en la estructura de la 1,4-naftoquinona.

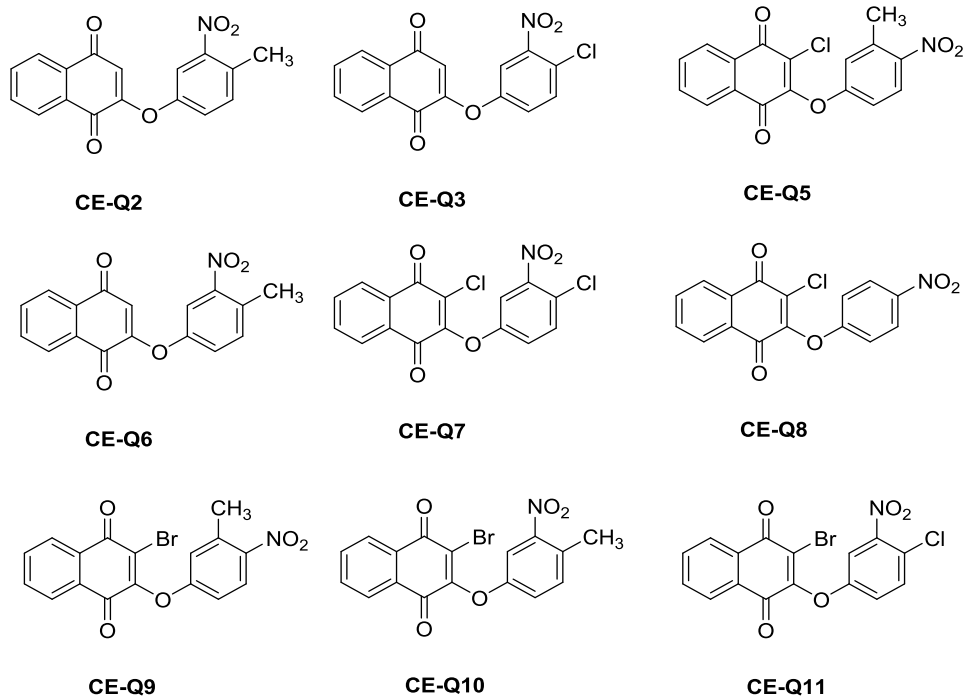


Figura 10 Compuestos derivados de 1,4-naftoquinonas a evaluar. Los compuestos fueron sintetizados a partir de la estructura quinona como su principal núcleo, agregando como nuevo dos grupos halogenados: bromo y cloro, posicionados en diferentes partes de la estructura, junto con el grupo nitro e hidrogeno.

3.2 Lugar donde se realizaron las evaluaciones de los derivados de 1,4-naftoquinonas.

- La evaluación *in vitro* fue realizada en el Departamento de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- La citotoxicidad fue evaluada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- La evaluación *ex-vivo* fue realizada en el Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas perteneciente al Instituto Politécnico Nacional de la Ciudad de México.
- La evaluación *in silico* fue trabajada con el Departamento de Bioinformática de la Facultad de Química perteneciente a la Universidad de la República de Uruguay.

3.3 Evaluación *in vitro* de los nuevos derivados de 1,4-naftoquinonas sobre epimastigote.

3.3.1 Condiciones de cultivo de epimastigote de *T.cruzi*.

Los epimastigotes fueron cultivados en un medio de cultivo axénico compuesto por un caldo de infusión cerebro-corazón (BHI), suplementado con suero fetal bovino al 10% y 1% de estreptomicina con penicilina a 500 mg en una incubadora a 28°C (Cristian Aurazo, 2014) (Fournet *et al.*, 1990).

3.3.2 Solución Stock y diluciones seriadas de los compuestos derivados de 1,4-naftoquinona.

Los compuestos fueron proporcionados en forma pura en polvo y se prepararon soluciones stock a una molaridad de 24 mM, el cual cada compuesto fue pesado de 2 a 4 mg a evaluar y re suspendidos en 1 ml con DMSO menor a 1%.

3.3.3 Evaluación *in vitro* de epimastigote.

El ensayo se realiza con la fase exponencial de epimastigote de cepa INC-5 y NINOA en cultivo al día 5, donde se colocó 10 µl en la cámara de Neubauer para su conteo y alcanzar una concentración inicial de 1×10^6 células/mL. Se realizó un *screening* inicial para evaluar el (Porcentaje de inhibición de crecimiento del parásito) %PIC y saber si existe una actividad biológica de los nuevos derivados 1,4-naftoquinonas. Los compuestos fueron probados a partir de 10 µM en una placa de 96 pocillos, donde se colocó 295 µl de medio con parásitos con su concentración inicial y 5 µl de compuesto, por

triplicado. El crecimiento del parásito fue medido por absorbancia a 630 nm al día 0 y 5 de inoculación, todos los compuestos que hayan obtenido un PIC mayor al 70%, se utilizaron para realizar el IC₅₀ a diferentes diluciones seriadas. Esta prueba constó de un blanco en condición de esterilidad con ausencia de parásitos y DMSO, la placa de 96 pocillos fue incubada a 28°C.

El porcentaje de inhibición fue calculado con la siguiente fórmula:

$$PIC = \{1 - (ABS\ p5 - ABS\ p0 / ABS\ b5 - ABS\ b0)\} * 100$$
, donde:

- P5: Absorbancia problema día 5
- P0: Absorbancia problema día 0
- ABS b5: Absorbancia blanco día 5
- ABS b0: Absorbancia blanco día 0

Para determinar el IC₅₀ de los compuestos antes mencionados se probó a diferentes diluciones seriadas cada compuesto; 5 µM, 2.5 µM, 1,25 µM y 0.625 µM, realizado por triplicado y con un control de parásito con medio axénico y parásitos con medio axénico y DMSO. La evaluación de IC₅₀ fue realizada por medición de absorbancia al día 0 y al día 5 de inoculación y los datos de cada concentración fueron calculados con la fórmula de %PIC por triplicado y analizados en el programa Origin Lab 8 SROv8.0724 (B724) OriginLab Corporation, siendo la concentración mínima necesaria del compuesto para reducir el 50% de los epimastigotes. En cada ensayo se utilizó un fármaco de

referencia; nfx, a las mismas concentraciones y diluciones seriadas (Vázquez *et al.*, 2015).

3.4 Evaluación *ex-vivo* de tripomastigote.

3.4.1 Condiciones de cultivo de tripomastigote.

Se infectaron ratones CD1 de 6-8 semanas de edad con tripomastigotes por vía peritoneal con las cepas INC-5 y NINOA de *T.cruzi*. El curso de la infección continuó durante 4-6 semanas, cerciorando que llegue a una alta parasitemia para la evaluación por medio de conteo de gota de sangre en la cámara de neubaeur y una vez obtenido, se extrae por punción cardíaca utilizando heparina sódica como anticoagulante. Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-Z00-1999) publicada el 22 de agosto de 2009 (Chacón-Vargas *et al.*, 2017).

3.4.2 Evaluación *ex-vivo* de tripomastigote en cepa INC-5 y NINOA.

La sangre se extrajo y se ajustó a 1×10^6 tripomastigotes del flujo sanguíneo / mL, contado por medio de la cámara de neubaeur. En cada pocillo de la placa de 96 pocillos, se sembraron 90 μ L de sangre infectada y 5 μ L de derivados de 1,4-naftoquinonas y diluciones de fármacos de referencia; bzl y nfx, alcanzando en cada pocillo un volumen final de; 100 μ L. Cada ensayo se realizó por triplicado. Los primeros 2 compuestos con el mejor IC₅₀ en cada cepa en epimastigote, fueron evaluados en tripomastigote en ambas cepas, realizando la evaluación con diluciones seriadas a; 20 μ M, 10 μ M y 5 μ M. Las microplacas se incubaron a 4 ° C durante 24 h. Los tripomastigotes del torrente

sanguíneo se cuantificaron por el método de Brener-Pizzi, colocando 5 μ L de sangre en un portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos de 13 \times 13 mm. Los protozoos móviles se contaron en 15 campos a aumento de 40X utilizando un microscopio óptico. Todos los compuestos se analizaron con un porcentaje de lisis > 50, donde se utilizaron 3 concentraciones para poder alcanzar la concentración de lisis del 50% de la población (CL_{50}). Como control negativo de la lisis, se usaron pozos con tripomastigotes sanguíneos no tratados y como control positivo, se usaron pocillos con los fármacos de referencia (nfx y bzl). El porcentaje de lisis se determinó comparando los tripomastigotes restantes con el control negativo. LC_{50} se determinó con la herramienta de regresión lineal (Chacón-Vargas *et al.*, 2017).

3.5 Citotoxicidad inespecífica de los derivados de 1-4 naftoquinonas en macrófagos murino J774 y células hepáticas murina de hepatocito BpRc1 (ATCC® CRL-2217™) con ensayo de viabilidad celular con MTT.

3.5.1 Condiciones de Cultivo de la línea celular murina de hepatocito BpRc1 (ATCC® CRL-2217™).

La línea celular BpRc1 (ATCC® CRL-2217™). utilizada se cultivó en condiciones óptimas para el crecimiento, es decir, las células se mantuvieron a una temperatura de 37 ° C, humedad relativa de ≈82%, atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en una incubadora con atmósfera de CO₂ (Thermo Scientific). Se utilizaron los medios de cultivo recomendados (GIBCO®) suplementados con penicilina / estreptomicina (GIBCO®) y suero fetal bovino (SBF, GIBCO®). El mantenimiento de la línea celular utilizada se realiza de acuerdo con la información proporcionada por la guía ATCC correspondiente (Gómez-Treviño, A. *et al*, 2013).

3.5.2 Evaluación de citotoxicidad en línea celular murina de hepatocitos BpRc1 (ATCC® CRL-2217™).

Para establecer una medida de citotoxicidad de naftoquinonas, se prepararon placas de cultivo celular de 96 pocillos con una línea celular murina de hepatocito BpRc1 (ATCC® CRL-2217™), donde se dejaron incubar por 24 horas en temperatura de 37 °C, humedad relativa de 82%, atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 70-80% en cada pocillo. Los compuestos fueron expuestos pasada las 24 horas, por triplicado,

se colocaron 3 concentraciones; 20 μ M, 10 μ M y 5 μ M, se colocó 95 μ l de medio y 5 μ l de cada compuesto, se dejó incubar la placa con los compuestos por 24 horas.

3.5.2.1 Evaluación de viabilidad de los nuevos derivados de 1,4-naftoquinonas.

La viabilidad fue evaluada por medio del método de tinción de rojo neutro. La línea celular entró en contacto con los compuestos a la misma concentración utilizada en el ensayo *in vitro*. El efecto citotóxico se desarrolló por exposición directa al contacto con la preparación por 24 horas. El método para determinar la viabilidad celular fue establecido por Scudeiro (Scudeiro, D. *et al.*, Cancer Research, 1998)

3.5.2 Cultivo celular de macrófagos murinos J774.

La línea celular de macrófagos murinos J774 fue cultivada con medio RPMI 1640 (GIBCO) con SFB al 2% y una temperatura de 37 °C con 95% de humedad y 5% CO₂.

3.5.3 Ensayo de citotoxicidad en línea de macrófagos murinos J774.

La evaluación de citotoxicidad en macrófagos se realizó solo con los 4 mejores compuestos que se utilizaron en la evaluación *ex-vivo* en tripomastigote. El ensayo se realizó en una cajilla de 96 pocillos, donde en cada pocillo se colocaron 50,000 células de macrófagos y se dejó incubar por 24

horas para alcanzar una confluencia del 70-80% de macrófagos. A partir de las 24 horas se desechó el medio antiguo y se colocó 95 μ l de medio nuevo con 5 μ l de la concentración de cada compuesto a probar por triplicado hasta obtener un volumen final de 100 μ l, las concentraciones fueron; 20 μ M, 10 μ M y 5 μ M. En la placa se utilizaron los siguientes controles:

- Positivo: macrófagos con medio de cultivo
- Negativo: macrófagos sin medio de cultivo
- Fármaco de referencia: nfx (a las mismas concentraciones)

Se dejó incubado por 24 horas a una atmosfera de 37°C con 95% de humedad y 5% de CO₂.

3.5.3.1 Ensayo de viabilidad de macrófagos murinos J774 de los nuevos derivados de 1,4-naftoquinonas.

Pasado las 24 horas se retiró el medio de cultivo de la placa con los compuestos y se realizaron 2 lavados con PBS y se realizó el ensayo de viabilidad por MTT. Se preparó la solución de MTT (0.1mg/ml) en PBS estéril 0,2% glucosa (200 mg, PBS 10x 10 mL, agua miliQ 90 mL) y se adicionaron 100 μ L de esta solución en cada pocillo. Se incubo por 3 horas a 37 °C con 95% de humedad y 5% de CO₂. Luego de este procedimiento se retiró la solución de MTT de la línea celular y se adiciono en cada pocillo 100 μ L de DMSO, se dejó actuar por 30 minutos en la incubadora y se realizó la lectura por medición de absorbancia a 570 nm.

Para el porcentaje de cada compuesto se utilizó la siguiente formula:

%citotoxicidad: $(100 - (\text{promedio de células con tratamiento} / \text{células sin tratamiento}) * 100)$.

3.6 Ensayo *in silico*

El modelo farmacoforo fue realizado con el programa (MOE 2015.10) Molecular Chemical Computing Group Inc suite en Linux en una estación de trabajo con un procesador de cuatro núcleos equipado con Hyperthread. Las estructuras tridimensionales de las moléculas fueron presentadas por minimización de energía por medio de MMFF94x como campo de fuerza (Halgren 1999) y el programa (MOE 2015.10).

Para crear el modelo farmacofórico fue utilizado el esquema de MOE polaridad carga hidrofobico (PHC), el programa en cada estructura identificará cual es la parte responsable de cada molécula que tenga la actividad biológica (Vera et al., 2016).

4 Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico Origin Pro 8 para realizar el análisis de ANOVA para evaluación *in vitro*. La evaluación *ex-vivo* fue realizar por regresión lineal donde la variable dependiente son las concentraciones a probar y la variable independiente el resultado de CL₅₀.

5 Resultados

5.1 Obtención de Porcentaje de inhibición de crecimiento e IC₅₀ de 1,4-naftoquinonas sobre epimastigote.

Inicialmente se realizó un *screening* para poder identificar cuales derivados de la 1,4-naftoquinonas tenían una actividad arriba del 70% PIC (Porcentaje de inhibición de crecimiento) sobre las formas de epimastigote en dos cepas: INC-5 y NINOA, iniciando a una concentración de 10 μ m. La mayoría de estos compuestos mostraron ser inhibidores del crecimiento frente a la forma de epimastigote de *T.cruzi*. Los compuestos fueron disueltos en DMSO en donde la concentración no alcanzara más del 1%. En respuesta al *screening* (Tabla II) la mayoría de compuestos mostro tener arriba del 70 %PIC, a excepción del Ce-Q2, el cual mostro tener un porcentaje bajo al esperado por ser un compuesto sin ambos halógenos y tener un sustituyente el grupo nitro y un hidrogeno, inclusive el nfx con cepa INC-5 mostro ser menos efectiva que en cepa NINOA, a partir del compuesto Ce-Q-3 a Ce-Q11 la mayoría de compuestos en ambas cepas mostraron tener buena actividad biológica. En la cepa INC-5 el compuesto Ce-Q2 y Ce-Q8 fueron los de menor porcentaje junto con el nfx, teniendo menos del 70 % PIC. En cepa NINOA el compuesto con el menor porcentaje fue Ce-Q2, en el caso del nfx alcanzo un 99 % PIC. A partir de los resultados del *screening* y comprobando que tienen actividad biológica sobre *T.cruzi* se procedió a realizar el IC₅₀.

Tabla II Porcentaje de inhibición de crecimiento sobre epimastigote a 10 μ M.

Compuesto	Cepa INC-5	Cepa NINOA
Ce-Q2	43 \pm 0.03	65 \pm 0.04
Ce-Q3	97 \pm 0.01	94 \pm 0.02
Ce-Q5	100 \pm 0.02	95 \pm 0.05
Ce-Q6	96 \pm 0.02	96 \pm 0.005
Ce-Q7	98 \pm 0.01	100 \pm 0.01
Ce-Q8	61 \pm 0.23	100 \pm 0.06
Ce-Q9	95 \pm 0.04	100 \pm 0.07
Ce-Q10	82 \pm 0.10	100 \pm 0.01
Ce-Q11	100 \pm 0.07	93 \pm 0.008
Nfx	50 \pm 0.36	99 \pm 0.02

Cada compuesto derivado de 1,4- naftoquinonas fue probado sobre dos cepas de epimastigote: INC-5 y NINOA. El ensayo comprobó la actividad biológica de los derivados a una concentración inicial de 10 μ m, donde la mayoría de los 9 compuestos tuvieron actividad biológica arriba del 70% de PIC (Porcentaje de inhibición de crecimiento) y se comparó con el tratamiento farmacológico actual (Nifurtimox) a la misma concentración. Cada compuesto viene con la desviación std \pm correspondiente.

5.1.1 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria en *T. cruzi*

Para cada derivado, se realizó un ensayo de dosis-respuesta inicial de 24 mM para obtener 5 concentraciones diferentes; 10 μ M, 5 μ M, 2.5 μ M, 1.25 μ M, 0.625 μ M y calcular el IC₅₀ (concentración inhibitoria del 50% de parásitos), que fue realizado por el programa, OriginLab Pro 8. Cada compuesto fue realizado por triplicado en sus diferentes concentraciones. El nfx fue utilizado como el fármaco tripanosomicida de referencia, solamente el compuesto Ce-Q2 fue descartado por no tener un porcentaje de inhibición de crecimiento al exponerlo a 10 μ M en ninguna de las dos cepas. El set de naftoquinonas expuestas exhibieron una potente actividad biológica sobre el parásito, en la Cepa INC-5 (Tabla N° 2) la mayoría de los compuestos tuvieron mejor actividad sobre el parásito que nfx (1.30 μ M), destacando el compuesto Ce-Q9 (0.04 μ M) y Ce-Q10 (0.41 μ M) entre el set del grupo de naftoquinonas con una actividad inhibitoria más potente a diferencia que el nfx, donde los compuestos que continúan teniendo un buen pronóstico de actividad biológica son: Ce-Q6 (0.51 μ M) y Ce-Q8 (0.64 μ M) comparándolo con el compuesto Ce-Q3 (1.63 μ M) que no mostro tener efecto y siendo aún menos activo que el nfx.

En el resultado de la cepa NINOA (Tabla III), los compuestos resultaron ser más susceptibles a comparación de la cepa INC-5. La mayoría de los derivados de naftoquinonas eran similares al nfx (1.97 μ M), el compuesto que destacó fue el Ce-Q11 (1.14 μ M) teniendo el mejor IC₅₀ pero aun así mostrando ser equipotente al nfx. A comparación de ambas cepas el menos apto con IC₅₀ fue

el compuesto Ce-Q3 (2.26 μ M) junto con el compuesto Ce-Q6 (3.06 μ M), que ambos mostraron ser menos potentes que el nfx y por lo tanto su actividad no es buena en *T.cruzi* como dentro de los 8 compuestos derivados de 1,4-naftoquinonas.

Tabla III. Concentración mínima inhibitoria del 50% de parásitos (IC50) en cepa INC-5 y NINOA de epimastigote de *T.cruzi* (media + DE)

Compuesto	INC-5	NINOA
Ce-Q3	1.63±0.02	2.26±0.07
Ce-Q5	0.67±0.02	1.45±0.03
Ce-Q6	0.51±0.02	3.06±0.05
Ce-Q7	0.66±0.01	2.15±0.83
Ce-Q8	0.64±0.02	1.41±0.05
Ce-Q9	0.04±0.02	1.84±0.18
Ce-Q10	0.41±0.01	1.70±0.42
Ce-Q11	0.88±0.03	1.14±0.03
Nfx	1.30±0.23	1.97±0.05

^aCompuesto a diferentes diluciones (10 μ M, 5 μ M, 2.5 μ M, 1.25 μ M, 0.625 μ M)
Los datos representan la desviación estándar \pm de los experimentos por triplicado.

5.2 Evaluación de tripomastigote en cepa INC-5 y NINOA.

Los compuestos fueron evaluados en tripomastigote en ambas cepas utilizadas en la evaluación *in vitro* de epimastigote: INC-5 y NINOA. Eligiendo los 2 mejores compuestos con la mejor actividad de IC₅₀ en la evaluación *in vitro* de cada cepa. En el caso de la cepa INC-5 se escogió el compuesto Ce-Q9 (IC₅₀: 0.04 μ M) y Ce-Q10 (IC₅₀: 0.41 μ M) y en cepa NINOA fue: Ce-Q11 (IC₅₀: 1.14 μ M) y Ce-Q18 (IC₅₀: 1.41 μ M), aun así, se tomó la decisión de evaluar los 4 compuestos sobre tripomastigote en cepa INC-5 y NINOA. La evaluación fue realizada para obtener el CL₅₀ (Concentración letal de 50% de parásitos), siendo determinada partir de los porcentajes de reducción junto con el logaritmo de la concentración de cada compuesto. Los resultados (Tabla IV) en la cepa INC-5 destacó el compuesto Ce-Q10 con (CL₅₀: 24.74 μ M) y en cepa NINOA Ce-Q11 (CL₅₀: 20.01 μ M), manteniendo el rango similar a los fármacos de referencia que fueron utilizados: nfz y bzI. En cepa INC-5 dentro de los 4 compuestos, ninguno destaco con una buena actividad biológica, a comparación con el nfx y bzI, pero aun así el que tuvo la mejor actividad dentro de los 4 compuestos fue el Ce-Q10 (CL₅₀: 24.74 μ M). En el caso de la cepa NINOA, solo 1 compuesto de los 4, destaco a diferencia de los fármacos de referencia, como es el caso del Ce-Q11 (CL₅₀: 20.01 μ M) demostró ser similar al nfx (CL₅₀: 20.06 μ M) pero a diferencia del bzI (CL₅₀: 23.50 μ M) mostro tener una mayor actividad.

Tabla IV Resultados de Concentración letal del 50% de parásitos de tripomasigote.

COMPUESTO	INC-5	Error	NINOA	Error std
	CL ₅₀ (μM)	std	CL ₅₀ (μM)	
CE-Q8	39.11	9.99	35.03	3.97
CE-Q9	27.50	7.75	35.36	4.56
CE-Q10	24.74	10.00	28.10	5.57
CE-Q11	24.76	6.84	20.01	7.54
NFX	20.03	11.33	20.06	3.91
BZL	-----		23.50	9.09

La tabla muestra los valores de concentración letal del 50 % de tripomastigote en dos cepas: INC-5 y NINOA, junto al error std por ser un método de apreciación. Donde los compuestos mostraron tener actividad sobre el parásito y fue comparado con los fármacos que se conocen actualmente como parte del tratamiento: bzl (benznidazo) y nfx (nifurtimox).

5.3 Citotoxicidad en Hepatocitos BpRc1 (ATCC® CRL-2217™)

Los derivados de naftoquinonas en 24 horas no presentaron citotoxicidad (Figura 2), a excepción de los compuestos Ce-Q2, Ce-Q3, Ce-Q9 y Ce-Q10 que a una concentración de 20 μ M mostraron tener más del 50% de toxicidad, a diferencia del fármaco de referencia utilizado: Nifurtimox, el cual no rebaso el 20% de toxicidad a esa misma concentración. En la Figura 1 a concentración de 10 μ M y 5 μ M mostraron más del 75% de viabilidad en donde en el caso de los compuesto, los grupos hidrogeno y grupo metilo, no favorece la actividad en una línea celular. El mejor compuesto que tuvo menor toxicidad y fue abajo del 50 % en la concentración 20 μ M es el Ce-Q11 el cual en su estructura esta participe los dos halógenos: bromo y el color y un grupo nitro. El compuesto Ce-Q11 en las otras dos concentraciones se mantuvo similar o más abajo que Nfx, donde se puede conjeturar con más razón que la posición del grupo nitro en la molécula y la participación de ambos halógenos ayudan que sea menos toxico y se pueda usar a concentración más alta. Se ha observado que la lapachona, estructura de donde proviene la quinona es toxica para una variedad de cáncer en humanos y siendo parte este mecanismo de acción también el responsable de su comportamiento tripanosomicida como inhibidor del ADN topoisomerasa II, induciendo una nueva vía de muerte celular independiente a la caspasa y p53, aumentando la producción de radicales de oxígeno (Salas, Faúndez, Morello, Maya, & Tapia, 2011).

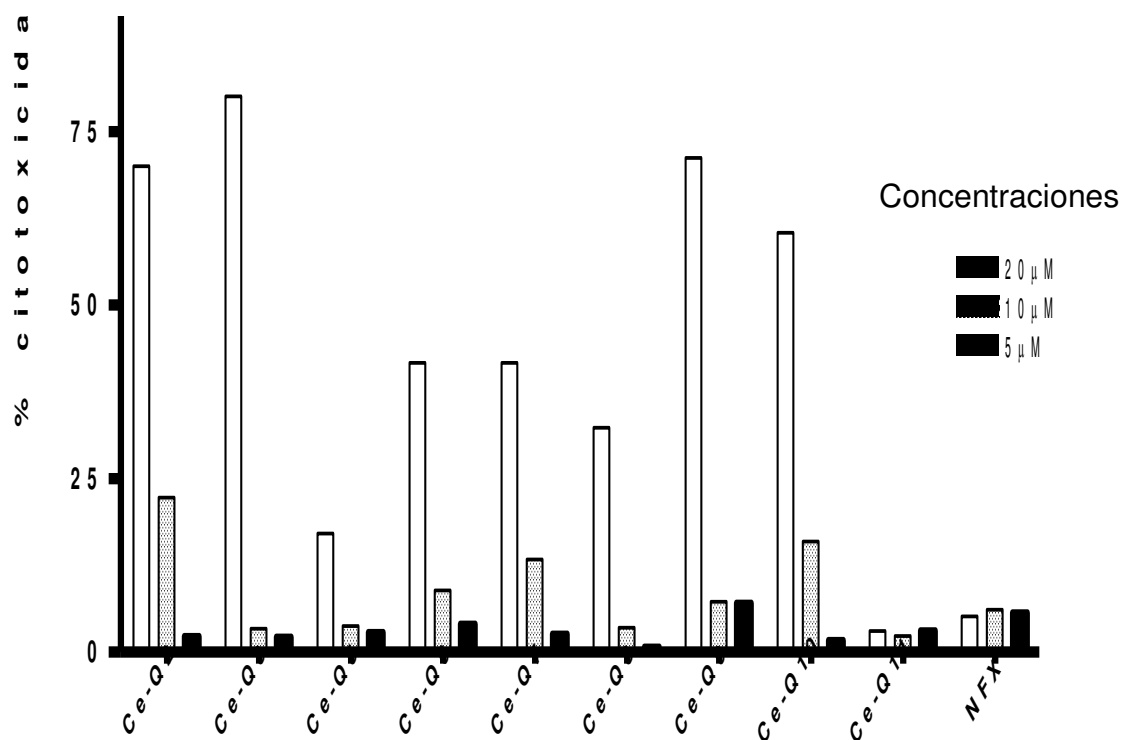


Figura 11 Porcentaje de citotoxicidad en los derivados de 1,4-naftoquinonas en una línea celular de Hepatocitos BpRc1. La grafica muestra el resultado de toxicidad en una línea celular de BpRc1 de los 9 compuestos derivados de 1,4-naftoquinonas, utilizando un fármaco de referencia (nfx) a 3 diferentes concentraciones (20, 10, 5 μ M) en donde las concentraciones de 5 y 10 μ M tuvieron un porcentaje menor al 25% de toxicidad, destacando el compuesto Ce-Q11 similar o menor al nfx.

5.4 Citotoxicidad en macrófagos murino J774

La prueba fue realizada con 4 compuestos (Ce-Q8, Ce-Q9, Ce-Q10 y Ce-Q11) derivados de 1,4-naftoquinonas fueron seleccionados por tener la mejor actividad de evaluación *in vitro* en epimastigote y fueron probados en tripomastigote. La citotoxicidad se realizó con 3 concentraciones: 20 μ M, 10 μ M y 5 μ M, donde también se utilizó el fármaco de referencia (nfx) a las mismas concentraciones, aun así se conoce que la concentración de 7 μ M, no es toxica, ya que es la dosis recomendada en el tratamiento agudo. Los resultados obtenidos muestran que a la concentración de 20 μ M del compuesto Ce-Q9 a Ce-Q11 mostraron tener una toxicidad de más del 50%, en el caso del compuesto Ce-Q8 donde el porcentaje de toxicidad no atraviesa más del 25% y conforme bajamos concentraciones resultaba menos toxico a diferencia del nfx.

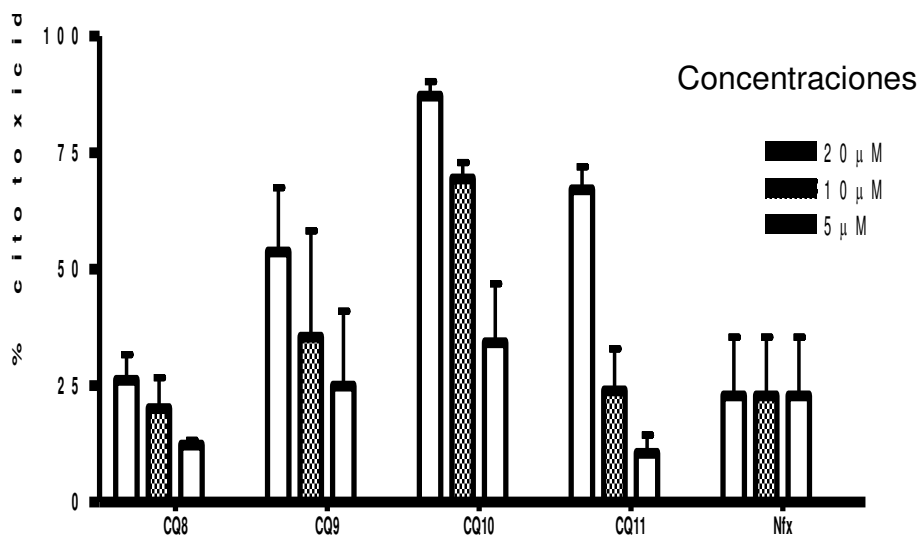
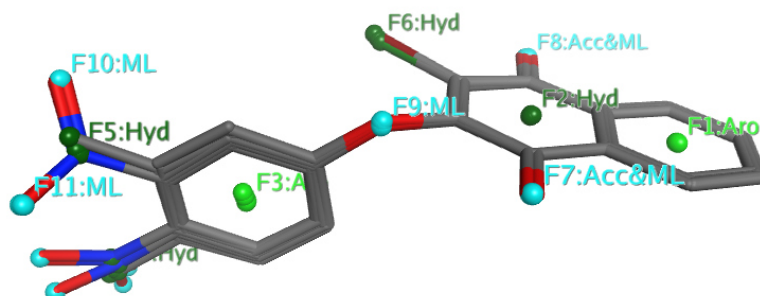


Figura 12 Evaluación de citotoxicidad de derivados de 1,4-naftoquinonas en una línea celular de macrófagos murinos. La grafica muestra el resultado de 4 compuestos derivados de 1,4-naftoquinonas, donde el compuesto Ce-Q8 mostro ser el compuesto con una buena toxicidad menor al 25% a diferencia del nfx, el cual matuvo el 25 % de toxicidad a las 3 concentraciones.

5.5 Modelo farmacofórico

Para generar el modelo farmacofórico se alinearon las nueve moléculas ensayadas mediante una técnica de alineamiento flexible. El alineamiento flexible consiste en una superposición de las estructuras en 3D minimizando las distancias relativas de los átomos equivalentes de cada par de moléculas a ser alineadas e incluyendo la flexibilidad a lo largo de los grados de libertad que refieren a ángulos diedros de los enlaces rotables. El modelo farmacofórico se construyó utilizando el esquema PCH (polar-charged-hydrophobic) del programa MOE. El farmacóforo fue construido por regla de mayorías en donde la característica a ser incluida debería estar presente en el 60% de las moléculas alineadas. Las principales características encontradas a lo largo de todas las encontradas fueron:



Nomenclatura unificada de las características encontradas

Aro: Anillos aromáticos

Hyd: Centro hidrofóbico

Acc: Capacidad aceptora de enlaces de hidrógenos

ML: Sitio de unión a metales

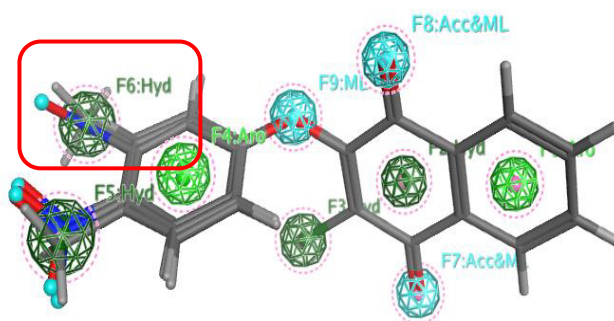
Las características pueden presentarse solas o combinadas con otras.

5.5.1 Evaluación de las hipótesis farmacofóricas

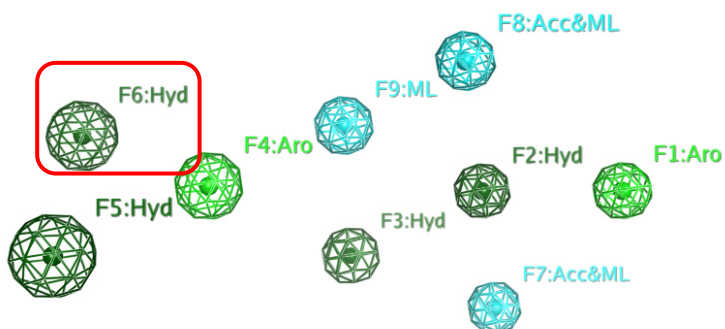
5.5.1.1 Modelo en epimastigote (Cepa INC-5)

Para evaluar las hipótesis del modelo farmacofórico las moléculas se clasificaron en grupos en función a su actividad demostrada en el experimento (bioactividad alta y bioactividad baja):

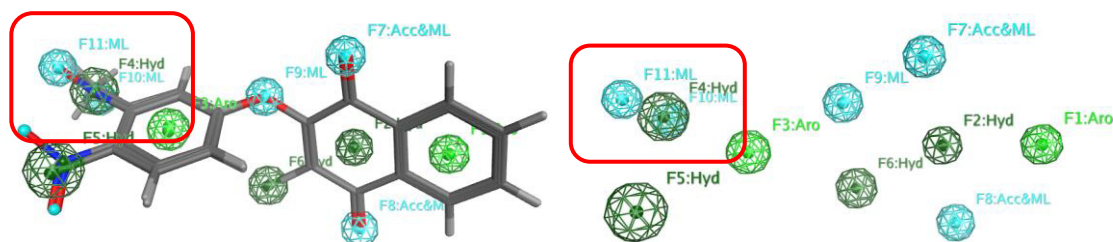
Farmacóforo de bioactividad alta



Se alinearon los 4 compuesto derivados de 1,4- naftoquinonas con la mejor actividad de IC_{50} , en donde las características similares se encontraron en el centro hidrofóbico (cuadro rojo) encontrando en la posición anclado uno de los dos grupos halogenados: bromo o cloro. En el esquema de arriba se puede apreciar la estructura molecular y abajo la estructura con solo las características farmacofóricas.

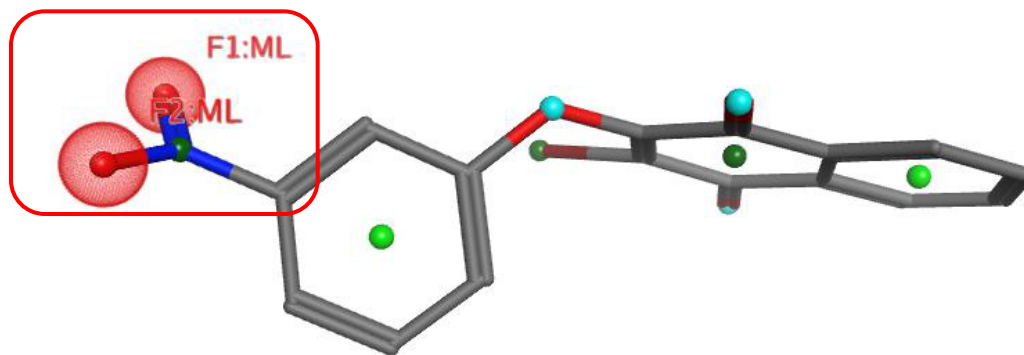


Farmacóforos de bioactividad baja



Se alinearon los 4 compuestos derivados de 1,4- naftoquinonas con la menor actividad de IC_{50} , en donde las características similares se encontraron en el centro hidrofóbico (cuadro rojo) encontrando en la posición anclado uno de los dos grupos halogenados: bromo o cloro, como algunos metales que se puedan anclar. En el esquema de arriba se puede apreciar la estructura molecular y abajo la estructura con solo las características farmacofóricas.

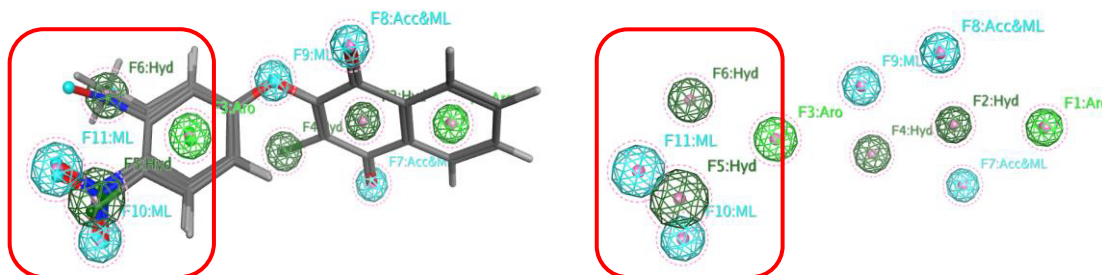
Diferencias observadas



La principal diferencia observada entre ambos grupos es la presencia de los aceptores de unión a metales (esferas celestes) desfavorece la bioactividad de la molécula. Se puede sugerir un efecto del grupo nitro NO_2 sobre la densidad electrónica de la molécula que reduce la densidad electrónica en el anillo hacia el grupo nitro debido a la gran electronegatividad de los oxígenos y el nitrógeno.

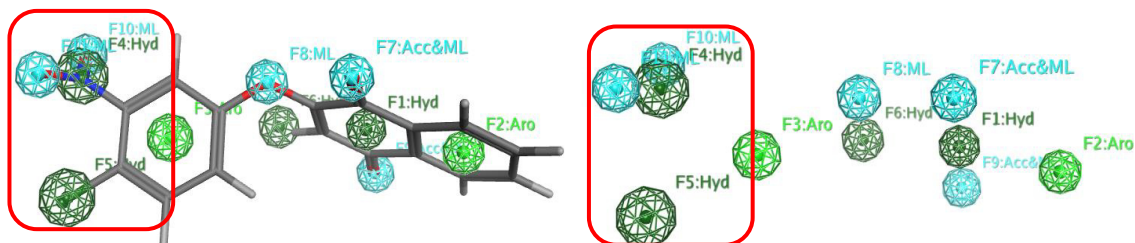
5.5.1.2 Modelo en epimastigote (Cepa NINOA)

Actividad Alta



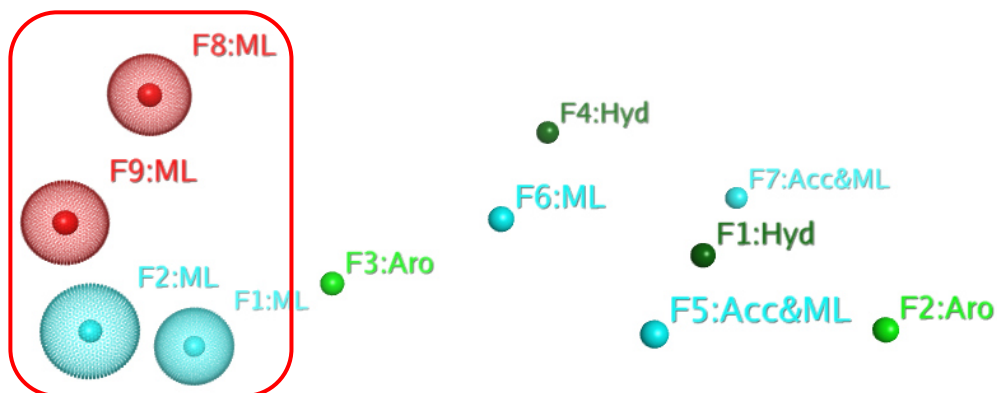
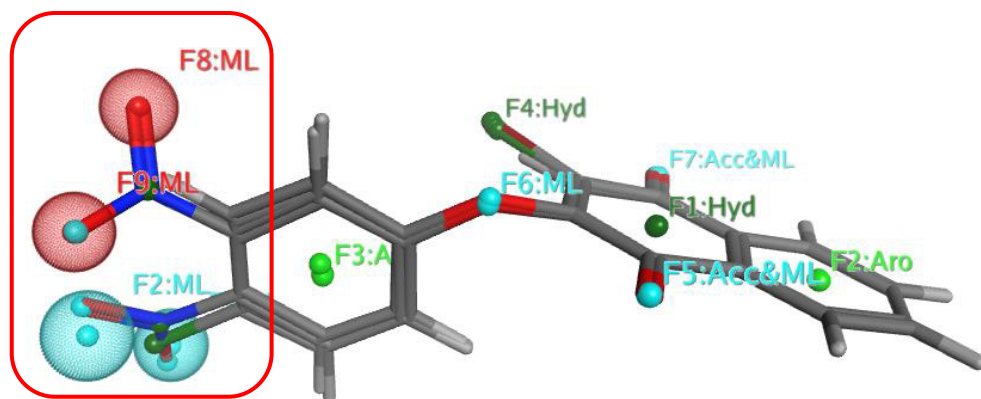
Se alinearon los 4 compuesto derivados de 1,4- naftoquinonas con la mejor actividad de IC₅₀ en la evaluación *in vitro* de cepa NINOA en epimastigote, en donde las características similares se encontraron en el centro hidrofóbico (cuadro rojo) encontrando en la posición anclado uno de los dos grupos halogenados: bromo o cloro.

Actividad Baja



En el caso de aquellos compuestos que tuvieron la menor actividad en la cepa NINOA, sus características (cuadro rojo) no favorecen la actividad estando en diferentes posiciones a la anterior con la actividad alta, destacando los mismos grupos con el centro hidrofobico y los grupos anclados a metales.

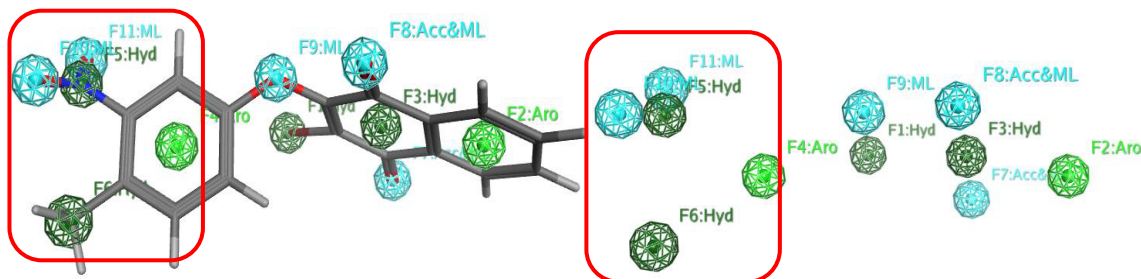
Diferencias observadas



La bioactividad se ve favorecida por la presencia de grupos aceptores de enlaces metálicos (como presencia del grupo nitro) en las regiones indicadas con las esferas de volumen celestes mientras que desfavorecidas por la presencia de dichos grupos en las regiones indicadas con las esferas de volumen rojas.

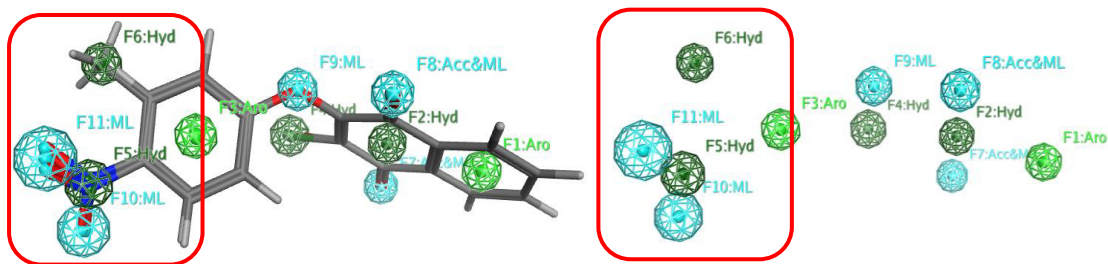
5.5.2 Modelo en tripomastigote - Cepa INC-5 y NINOA

Alta actividad

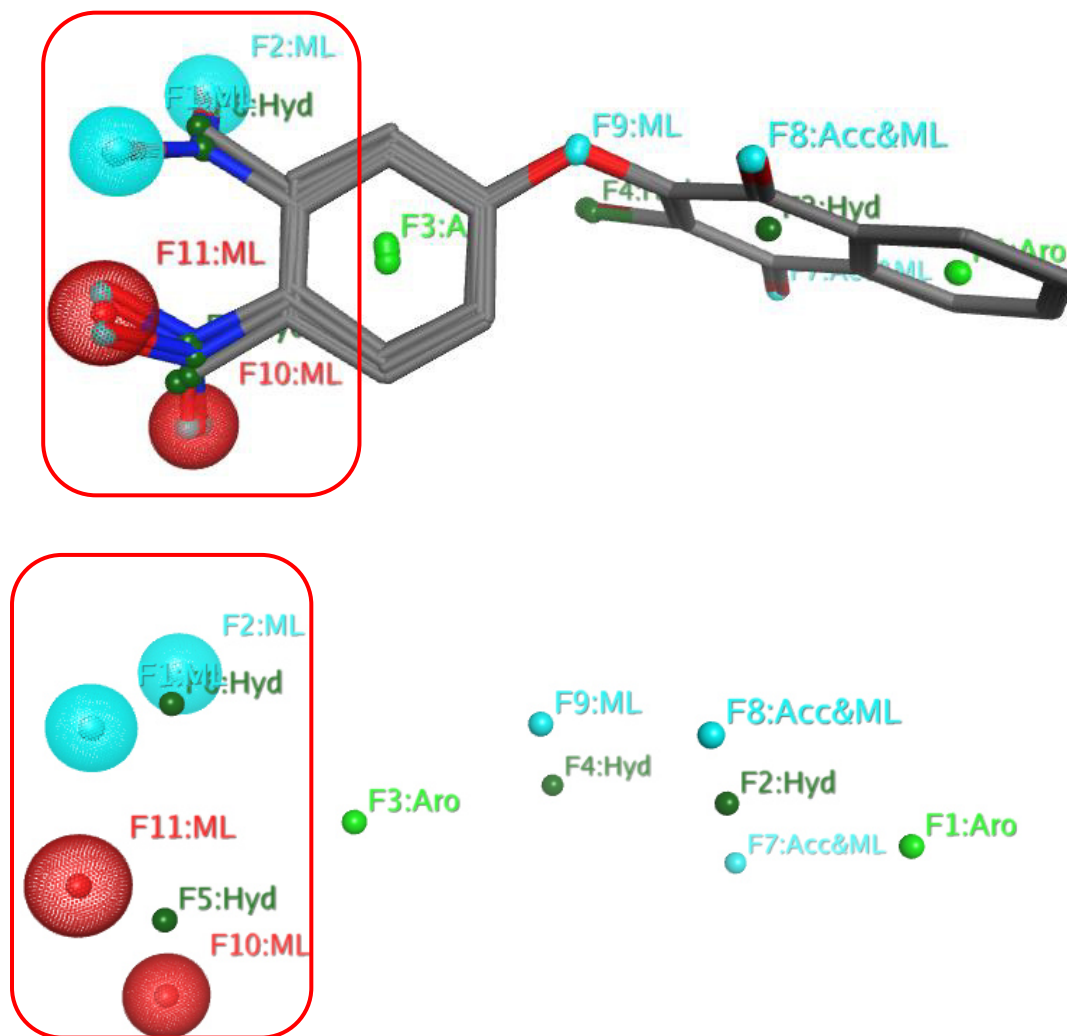


Se alinearon solamente los 2 compuestos derivados de 1,4- naftoquinonas con la mejor actividad de CL_{50} en tripomastigote de ambas cepas, en donde las características similares se encontraron en el centro hidrofóbico (cuadro rojo) encontrando en la posición anclado uno de los dos grupos halogenados: bromo o cloro, como algunos metales que se puedan anclar. En el caso del esquema de baja actividad los grupos posicionados en el lado opuestos no ayudan a generar una buena actividad (cuadro rojo).

Baja actividad



Diferencias observadas



La bioactividad se ve favorecida por la presencia de grupos aceptores de enlaces metálicos (como presencia del grupo nitro) en las regiones indicadas con las esferas de volumen celestes mientras que desfavorecidas por la presencia de dichos grupos en las regiones indicadas con las esferas de volumen rojas.

6 Discusión

6.1 Evaluación *in vitro* de los derivados de 1,4-naftoquinoas en epimastigote.

Esta investigación se centra en evaluar nuevos derivados de 1,4 naftoquinonas que sean capaz de tener actividad tripanosomicida sobre *T.cruzi* donde se sintetizaron 9 compuestos de donde solo 8 tuvo el mejor porcentaje de inhibición en la evaluación *in vitro* que el fármaco de referencia (nfx), teniendo variantes en los dos tipos de cepas que se utilizaron de *T.cruzi*; INC-5 y NINOA. Los compuestos fueron formados colocando dos grupos halogenados (bromo y cloro) en diferentes sustituyentes de la estructura quinonica, con el objetivo de saber cuál grupo en los compuestos tienen una actividad parasitocida y poder seguir desarrollando para encontrar fármacos que nos permita ir mejorando la actividad. Se conoce que los compuestos nitroheterocíclicos son caracterizados por tener un grupo NO_2 unido al anillo aromático como es el caso de los tratamientos actual bzl y nfx, atribuyendo este grupo en parte a la activación o parte de la efectividad de la actividad biológica (Salas *et al.*, 2011) donde se sugiere que la reducción se generan a partir de un radical nitro-anión (R-NO_2) produciendo una reacción de radicales libres de oxígeno (O_2 y H_2O_2). En la Figura 9 se aprecia la estructura molecular con los radicales en donde se colocando los diferentes grupos halogenados y el grupo nitro NO_2 y CH_3 .

Las moléculas fueron evaluadas biológicamente y agrupadas en tres grupos; I, II y III, para una mejor comprensión de los resultados. Para cada uno de estos

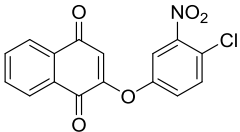
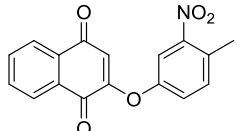
compuestos se realizaron ensayos dosis-respuesta para poder calcular el IC₅₀ (concentración inhibitoria del 50% de los parásitos), las concentraciones que se ensayaron fueron 10 µM, 5 µM, 2.5 µM, 1.25 µM, 0.625 µM. Los compuestos nifurtimox y benznidazol fueron utilizados como fármacos de referencia.

A partir de los resultados obtenidos en el %PIC la mayoría de los compuestos mostraron una actividad biológica contra el parásito. Los compuestos Ce-Q9 y Ce-Q10 en la cepa INC-5 mostraron tener la mejor actividad biológica, donde ambos compuestos comparten la característica de tener colocado en la estructura quinónica un grupo bromo, en el anillo aromático difieren por las diferentes posiciones de los grupos metilo y nitro.

En el caso de la cepa INC-5, la serie III destaco por tener dos compuestos con la mejor actividad, pero sin aún descartar a la serie II, donde los compuestos siguieron teniendo mejor actividad que el nfx (1.30 µM). En la serie I el Ce-Q3 (1.63 µM) fue el compuesto con la menor actividad que todos y siendo más alto que el nfx (1.63 µM), esto puede ser debido a la presencia de un hidrogeno en la estructura quinonica, en donde a partir de los 9 compuestos que fueron evaluados en el screening, el Ce-Q2 fue descartado por tener un porcentaje menor al 70%PIC esperado y por compartir la característica similar al hidrogeno en la estructura quinonica.

Derivados Serie I

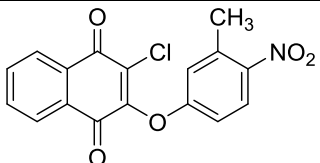
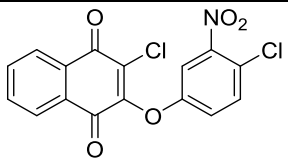
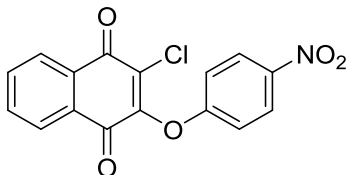
Tabla V Resultados de los derivados en Serie I en evaluación in vitro en epimastigote. Los dos compuestos fueron agrupados por tener un hidrogeno en su estructura quinonica y un grupo metil CH₃ como un grupo Cloro (Cl).

Compuesto	IC ₅₀ en epimastigote cepa INC-5 <i>T.cruzi</i> μM	IC ₅₀ en epimastigote cepa Ninoa <i>T.cruzi</i> μM
 CE-Q3	1.63±0.02	2.26±0.07
 CE-Q6	0.51±0.02	3.06±0.05

En la tabla se puede observar que la presencia del grupo metilo, en donde el compuesto Ce-Q6 fue con el de mejor actividad en cepa INC-5, en comparación con el efecto sobre la cepa NINOA, estos dos compuestos no tienen mejor actividad tripanosomicida que el nfx, sin embargo en la cepa INC-5 resultaron tener mejor actividad o ser equipotente al nfx.

Derivados Serie II

Tabla VI Resultados de los derivados de 1,4-naftoquinonas en Serie II en evaluación in vitro en epimastigote. La serie II se deriva por el grupo halogenado Cl anclado en diferentes partes de la estructura de la naftoquinonas, así como el grupo nitro NO₂ y metil CH₃.

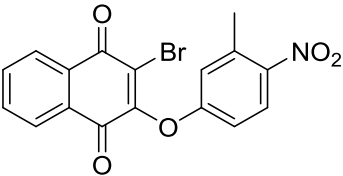
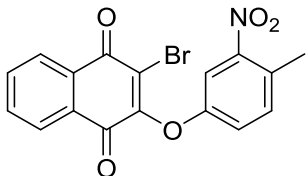
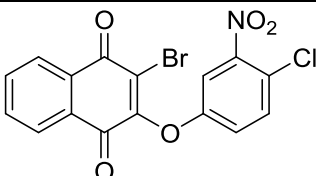
Compuesto	IC ₅₀ en epimastigote cepa INC-5 <i>T.cruzi</i> μM	IC ₅₀ en epimastigote cepa Ninoa <i>T.cruzi</i> μM
 CE-Q5	0.67±0.02	1.45±0.03
 CE-Q7	0.66±0.01	2.15±0.83
 CE-Q8	0.64±0.02	1.41±0.05

En la serie II, los compuestos tienen en su estructura anclada un grupo halogenado: Cl en diferentes partes la estructura naftoquinona, en la cepa INC-5 los 3 compuestos de esta serie tuvieron resultados similares, donde se observa que la presencia tanto de Cl, como NO₂ y CH₃ favorecen la actividad biológica y son aún mejor su actividad ante el fármaco de referencia: nfx. En la

cepa NINOA, los 3 compuestos mostraron una actividad biológica de IC₅₀ similares entre sí, superando o siendo del mismo rango que el nfx.

Derivados Serie III

Tabla VII Resultados de los derivados de 1,4-naftoquinonas en Serie III en evaluación in vitro en epimastigote. La serie III está conformado por un grupo halogenado Br anclado al núcleo de la estructura naftoquinonas donde se agrupan grupo NO₂ y CH₃ y en uno el grupo Cl.

Compuesto	IC ₅₀ en epimastigote cepa INC-5 <i>T.cruzi</i> μM	IC ₅₀ en epimastigote cepa Ninoa <i>T.cruzi</i> μM
 CE-Q9	0.04±0.02	1.84±0.18
 CE-Q10	0.41±0.01	1.70±0.42
 CE-Q11	0.88±0.03	1.14±0.03

La serie III en la cepa INC-5 tuvo mejores resultados ante el fármaco de referencia nfx (1.30 μM) siendo el Ce-Q9 el compuesto que destaco con la mejor actividad biológica de IC₅₀ (0.04 μM), donde el grupo bromo se encuentra

anclado en el núcleo quinónico y contiene grupo CH_3 como NO_2 , siguiendo el compuesto Ce-Q10 ($0.41 \mu\text{M}$) como el de segundo de mejor actividad dentro de los 9 derivados de naftoquinonas, donde el grupo bromo se encuentra posicionado de la misma manera que el compuesto Ce-Q9, cambiando las posiciones del grupo metil y nitro. En la cepa NINOA, los 3 compuestos fueron similares entre sí pero equipotentes al nfx, el compuesto que tuvo el mejor IC_{50} fue el Ce-Q11 ($1.14 \mu\text{M}$) donde en su estructura se encuentra anclado un grupo bromo en el núcleo de la naftoquinona, como en el caso de la evaluación en cepa INC-5, que el de mejor actividad fue el que tuvo anclado el Br en la estructura del núcleo de la naftoquinona.

6.2 Evaluación *ex-vivo* tripomastigote en cepa INC-5 y NINOA.

La evaluación en tripomastigote se centró solamente en los 4 mejores compuestos con la mejor actividad biológica en epimastigote, donde se evaluaron con las cepas INC-5 y NINOA, fueron comparados con los dos tratamientos actuales: nfx y bzI. En la cepa INC-5 los compuestos mostraron una actividad biológica muy similar entre si y no más activos que el nfx, pero dentro del set de los 4 compuestos de naftoquinonas el Ce-Q10 fue el destaco con un grupo halogenado en su estructura quinonica, en el caso de epimastigote este último fue el de mejor actividad con un grupo Br y grupo CH₃ y NO₂.

En el caso de la cepa NINOA, el compuesto Ce-Q11 mostro mejor actividad biológica que el nfx y bzI, donde se puede explicar por la colocación de ambos grupos halogenados Br y Cl en la estructura. Los demás compuestos mostraron ser mayores al bzI y nfx pero aun así se podría probar más adelante si a una dosis más alta se podría utilizar. Mostrando que ambas cepas difieren en los resultados y que por consiguiente seria objetivo de seguir buscando o añadiendo nuevos grupos.

La evaluación en los tripomastigotes de la corriente sanguínea es importante porque es la fase infectiva en los mamíferos y es la forma principal en la fase aguda de la infección donde la parasitemia es alta. Como se mencionó, los ensayos experimentales en ambas formas de parásitos muestran información diferente, en donde se midió la capacidad de los compuestos para

lisar tripomastigotes mientras se determinaba la viabilidad de los epimastigotes después de la exposición de los compuestos. En tripomastigotes, el efecto sobre la proliferación celular no se puede determinar porque en esta fase el parásito no se divide; sin embargo, se puede evaluar el efecto sobre la lisis celular, la pérdida de movilidad o la pérdida de infectividad (Chacón-Vargas *et al.*, 2017).

6.3 Citotoxicidad en macrófagos murino y hepatocitos.

El trabajo de citotoxicidad se realizó en dos líneas celulares con el objetivo de poder tener la certeza de que la mayoría de fármacos se metabolizan en hígado y este fue el caso en la línea célula de hepatocitos como en los macrófagos murinos por ser la primera línea celular que ataca el parásito al momento de ingresar al organismo. Los compuestos fueron preparados con 3 diluciones; 20 μM , 10 μM , 5 μM y probados en ambas líneas, donde la mayoría en el caso de la línea de hepatocitos a una concentración de 20 μM , el compuesto Ce-Q6 mostró una toxicidad más del 70%, teniendo un grupo CH_3 en su estructura, a diferencia del compuesto Ce-Q8 que fue el mejor compuesto en las 3 concentraciones, mostrando tener un porcentaje de toxicidad abajo del 10%. Por lo tanto, se puede pensar que probablemente la adición del grupo CH_3 no favorezca en la toxicidad a diferencia del compuesto Ce-Q8 que solamente tiene un grupo NO_2 y un grupo halogenado: Cl. En el caso de la línea celular de macrófagos solamente se utilizaron los 4 mejores compuestos con la mejor actividad biológica en la evaluación *in vitro*, donde el Ce-Q8 vuelve a destacar

teniendo un porcentaje de toxicidad debajo del 25% en las 3 concentraciones a diferencia de los demás compuesto, e inclusive tuvo menor toxicidad que el nfx.

7 Conclusión

De los 9 compuestos en la evaluación *in vitro*, el compuesto Ce-9 (cepa INC-5) y el compuesto Ce-Q11 (cepa NINOA) representan los de mejor actividad en epimastigote, donde ambos tienen colocando un grupo bromo en la estructura quinónica, demostrando que el Br es un grupo potente sobre esta fase de *T. cruzi* y ayudando a aumentar la actividad de la naftoquinona.

En el caso de la evaluación *ex vivo* en tripomastigote ninguno de los 4 compuestos que se trabajaron en ambas cepas fueron mejores que el fármaco de referencia, solo 1 compuesto el Ce-Q11 en cepa NINOA alcanzó a ser similar al nfx pero el bzl fue menos potente que estos 2 últimos.

En general la presencia de ambos halógenos principalmente el Br en la estructura de la naftoquinona, ayudan a aumentar la actividad en ambas fases de *T. cruzi* pero no llegan a ser muy superiores que el nfx o bzl. Dejando en claro que cada fase del parásito requiere condiciones de cultivo diversas como las metodologías utilizadas para evaluar el efecto de los compuestos, lo más óptimo sería seguir modificando los grupos en diversas estructuras quinónicas y seguir aportando más evaluaciones.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- Apt B, W., Heitmann G, I., Jercic L, M. I., Jofré M, L., Muñoz C. del V., P., Noemí H, I., ... Zulantay A, I. (2008). Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. *Revista Chilena de Infectología*, 25(5), 384–389. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182008000500013>
- Bermudez, J., Davies, C., Simonazzi, A., Pablo Real, J., & Palma, S. (2016). Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica*, 156, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.017>
- Bolognesi, M. L., Lizzi, F., Perozzo, R., Brun, R., & Cavalli, A. (2008). Synthesis of a small library of 2-phenoxy-1,4-naphthoquinone and 2-phenoxy-1,4-anthraquinone derivatives bearing anti-trypanosomal and anti-leishmanial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(7), 2272–2276. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.03.009>
- Cantú González, R. N., Palomo Ligas, L., Nery Flores, S. D., López López, L. I., & Barajas Bermúdez, L. (2012). Naftoquinonas : de simples pigmentos a moléculas terapéuticas. *Biológicas*, 14(2), 48–56.
- Carabarin, A., Gonzalez, M., Baylon, L., & Rosales, J. (2011). Enfermedad de Chagas, 84, 5–11.
- Castro, J. A. (2013). Efectos Tóxicos De Los Fármacos Utilizados Para El Tratamiento De La Enfermedad De Chagas. *Centro de Investigaciones*

Toxicológicas (CEITOXUNIDEF). CITEDEF, 81–85.

Chacón-Vargas, K. F., Noguera-Torres, B., Sánchez-Torres, L. E., Suarez-Contreras, E., Villalobos-Rocha, J. C., Torres-Martinez, Y., ... Rivera, G. (2017). Trypanocidal activity of quinoxaline 1,4 Di-N-oxide derivatives as trypanothione reductase inhibitors. *Molecules*, 22(2). <https://doi.org/10.3390/molecules22020220>

Cristian Aurazo, J. R. y C. A. J. (2014). y susceptibilidad a violeta de genciana “ in vitro ” de dos poblaciones nativas de Zaña , Lambayeque , Perú Trypanosoma cruzi : in vitro ground features and susceptibility to gentian violet of two native populations from Zaña , Lambayeque , Peru, 34(1), 69–75.

Curtis-Robles, R., Lewis, B. C., & Hamer, S. A. (2016). High Trypanosoma cruzi infection prevalence associated with minimal cardiac pathology among wild carnivores in central Texas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(2), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.04.001>

De Souza, W. (2009). Structural organization of Trypanosoma cruzi. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, 104(May), 89–100. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900014>

Esch, K. J., & Petersen, C. A. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 58–85. <https://doi.org/10.1128/CMR.00067-12>

- Fournet, B., Wieruszkes, J. M., Mendonça-previatos, L., & Xavier, T. (1990). Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Primary Structure of the Oligosaccharide Chain of Lipopeptidophosphoglycan of Epimastigote Forms of *Trypanosoma cruzi* *, 265(5), 2518–2526.
- Galaviz-silva, L., Mercado-hernández, R., Zárate-ramos, J. J., & Molina-garza, Z. J. (2017). Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and small mammals in Nuevo León, Mexico. *Revista Argentina de Microbiología*, (xx), 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.006>
- García-jordán, N., Berrizbeitia, M., & Concepción, J. L. (2015). Estudio entomológico de vectores transmisores de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural del estado Sucre, Venezuela. *Biomedica*, 35, 247–257. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2390>
- García-torres, I., & Pérez-montfort, R. (2011). Avances en la identificación de blancos terapéuticos y el diseño racional de fármacos contra la enfermedad de chagas. *Rev*, 30(2), 68–81.
- Jiménez-Coello, M., Acosta-Viana, K., Guzmán-Marín, E., Bárcenas-Irabién, A., & Ortega-Pacheco, A. (2015). American trypanosomiasis and associated risk factors in owned dogs from the major city of Yucatan, Mexico. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 21, 37. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0039-2>

Leyva, E. (2016). Importancia química y biológica de naftoquinonas . Revisión bibliográfica, (6).

Molina-Garza, Z. J., Mercado-Hernandez, R., Molina-Garza, D. P., & Galaviz-Silva, L. (2015). Trypanosoma cruzi -infected Triatoma gerstaeckeri (Hemiptera: Reduviidae) from Nuevo Leon, Mexico, and pathogenicity of the regional strain. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 35(3), 372–378.

Moraes, C. B., & Franco, C. H. (2016). Novel drug discovery for Chagas disease. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 0441(March), 1–9. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1160883>

Pérez-Molina, J. A., Perez, A. M., Norman, F. F., Monge-Maillo, B., & López-Vélez, R. (2015). Old and new challenges in Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(11), 1347–1356. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00243-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00243-1)

Pinto, A. V., & De Castro, S. L. (2009). The trypanocidal activity of naphthoquinones: A review. *Molecules*, 14(11), 4570–4590. <https://doi.org/10.3390/molecules14114570>

Porto-Carreiro, I., Attias, M., Miranda, K., De Souza, W., & Cunha-e-Silva, N. (2000). Trypanosoma cruzi epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *European Journal of Cell Biology*, 79(11), 858–

869. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00112>

Salas, C. O., Faúndez, M., Morello, A., Maya, J. D., & Tapia, R. a. (2011). Natural and synthetic naphthoquinones active against *Trypanosoma cruzi*: an initial step towards new drugs for Chagas disease. *Current Medicinal Chemistry*, 18(1), 144–161. <https://doi.org/10.2174/092986711793979779>

Sánchez, E., Vélez, M. C., Restrepo, M., Marín, J. S., & Gallego, D. (2016). Tripanosomiasis americana, una mirada desde el tratamiento. *Anales de La Facultad de Medicina*, 77(1), 39–44. <https://doi.org/10.15381/anales.v77i1.11551>

Santos, F. M., Mazzeti, A. L., Caldas, S., Gonçalves, K. R., Lima, W. G., Torres, R. M., & Bahia, M. T. (2016). Chagas cardiomyopathy: The potential effect of benznidazole treatment on diastolic dysfunction and cardiac damage in dogs chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 161, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.05.007>

Teixeira, A. R. L., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., & Nitz, N. (2011). Pathogenesis of Chagas ' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity, 24(3), 592–630. <https://doi.org/10.1128/CMR.00063-10>

Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., & de Souza, W. (2012). Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>

Vázquez, K., Espinosa-Bustos, C., Soto-Delgado, J., Tapia, R. A., Varela, J., Birriel, E., ... Salas, C. O. (2015). New aryloxy-quinone derivatives as potential anti-Chagasic agents: synthesis, trypanosomicidal activity, electrochemical properties, pharmacophore elucidation and 3D-QSAR analysis. *RSC Adv.*, 5(80), 65153–65166.
<https://doi.org/10.1039/C5RA10122K>

Vera, B., Vázquez, K., Mascayano, C., Tapia, R. A., Espinosa, V., Soto-Delgado, J., ... Paulino, M. (2016). Structural Analysis and Molecular Docking of Trypanocidal Aryloxy-quinones in Trypanothione and Glutathione Reductases: A Comparison with Biochemical Data. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 1102(May), 1–48.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1195283>

Vianna Martins, A., Patrícia Gomes, A., de Mendonça, E. G., Rangel Fietto, J. L., Alberto Santana, L., de Almeida Oliveira, M. G., ... Siqueira-Batista, R. (2012). Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio*, 16(1), 45–58.
[https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(12\)70057-7](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70057-7)